

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAYARA MAYSA DA SILVA CARVALHO

DETERMINAÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL DE PROTEÍNAS
EMPREGANDO CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

CURITIBA

2016

NAYARA MAYSA DA SILVA CARVALHO

DETERMINAÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL DE PROTEÍNAS
EMPREGANDO CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de
Alimentos no Curso de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra.

CURITIBA

2016

C331d

Carvalho, Nayara Maysa da Silva

Determinação do segundo coeficiente virial de proteínas empregando calorimetria de titulação isotérmica/ Nayara Maysa da Silva Carvalho. – Curitiba, 2016.

108 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2016.

Orientador: Marcos R. Mafra .

Bibliografia: p. 75-81.

1. Calorimetria. 2. Mecânica estatística. 3. Interação partícula-partícula. 4. Albumina - Cristalização. 5. Lisozima - Cristalização. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Marcos R.. III. Título.

CDD: 539.12

NAYARA MAYSA DA SILVA CARVALHO

**DETERMINAÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL DE
PROTEÍNAS EMPREGANDO CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO
ISOTÉRMICA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof^a. Dr^a. ALINE ALBERTI
Dep. Eng. Alimentos, UEPG



Prof^a. Dr^a. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 24 de janeiro de 2016.

Dedico este trabalho às pessoas que me inspiram, me motivam, e me fazem seguir em frente: minha família, Conceição, Jeronymo, Lais e Lara e meu namorado Igor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR, pela oportunidade e por toda a estrutura oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), que possibilitou a realização deste trabalho por meio concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcos R. Mafra, por acreditar em mim ao me confiar este projeto, pelas orientações sempre esclarecedoras e incentivadoras, pelos conhecimentos transmitidos e prontidão com que sempre me atendeu e ajudou.

Às professoras doutoras Aline Alberti e Maria Lucia Masson, por aceitarem compor a banca e por todas as contribuições para este trabalho.

À minha mãe, Conceição, a maior entusiasta de todos os projetos que realizei na vida, e ao meu pai, Jeronymo, que se tornou um exemplo de perseverança na busca pelo conhecimento. Agradeço por todo amor, apoio, carinho e cuidado que tiveram comigo, não só durante o mestrado, mas durante a vida toda. A vocês dedico todas as minhas conquistas.

À minha irmã, Lais, a maior incentivadora para que eu escolhesse o mestrado, por quem tenho profunda admiração. Agradeço imensamente por tudo o que me ensinou, e por estar sempre atenta às minhas dificuldades. Sem a sua influência na minha vida, estou certa de que este projeto não teria acontecido.

Ao meu namorado e companheiro de todas as horas, Igor, um agradecimento especial. Por sua compreensão devido aos longos meses de ausência, por todo o apoio e amor a mim dedicados, pelos incentivos sem fim e por ser meu norte durante a realização deste projeto.

À minha madrinha, Dada, por estar sempre presente e me incentivar neste projeto, além da ajuda com meus textos confusos e vírgulas incompreensíveis.

Aos queridos amigos e colegas do LATOS, por todas as conversas e contribuições.

Aos caríssimos amigos Daniela, Anderson, Sarah, Valéria e Cristina, por me oferecerem sempre seus ombros nos momentos de dificuldade e pelos ótimos momentos de descontração, que tornaram tudo mais fácil. Agradeço a amizade.

A minha prima, Letícia, por toda a ajuda dentro e fora do laboratório, pelas dicas sobre pesquisa e pelas caronas até o laboratório, que facilitaram muito a minha vida.

Às técnicas Andrea, Patrícia e Sheila, pelo auxílio essencial dentro dos laboratórios, mas sobretudo por toda a empatia que tiveram comigo, pelos momentos de desabafo e pela ajuda para lidar da melhor forma com as dificuldades enfrentadas no decorrer deste projeto.

Agradeço ao prof. Dr. Marco Aurélio de Oliveira Schuler, por toda ajuda, esclarecimentos e prontidão.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“In total, it is still a fact that over the last decades, it was still easier to fly to the moon than to describe the free energy of even the simplest salt solutions beyond a concentration of 0,1M or so”

(Kunz and Neueder)

RESUMO

O presente estudo teve como finalidade empregar a calorimetria de titulação isotérmica na avaliação das interações intermoleculares entre proteínas. Para isso foi obtido o segundo coeficiente virial calorimétrico, o qual se relaciona com o segundo coeficiente virial representando o desvio do comportamento ideal das soluções reais. Sabe-se que o segundo coeficiente virial é um instrumento relevante para a compreensão de processos industriais de separação de biomoléculas, como a cristalização e a precipitação. A metodologia utilizada no calorímetro de titulação isotérmica resultou na obtenção do calor de diluição das proteínas albumina de soro bovina e lisozima sob influência de diferentes condições experimentais. A partir deste dado foi obtido o segundo coeficiente virial calorimétrico. Avaliou-se o efeito do pH (pH 4,6, 5,4 e 7,4 para a albumina de soro bovina e pH 4,6 e 7,0 para a lisozima) e da concentração de cloreto de sódio como agente de cristalização (de 0,0 mol L⁻¹ a 0,5 mol L⁻¹ para ambas as proteínas) sobre os valores de segundo coeficiente virial calorimétrico. Observou-se na finalização das análises comparativas a existência de forte influência do pH e da força iônica sobre as interações moleculares. Para a albumina de soro bovina, o efeito do aumento da concentração salina gerou maiores valores do segundo coeficiente virial calorimétrico, conforme esperado pelo fenômeno de *salting in*, que representa o aumento da solubilidade, de acordo com a adição de sais no meio. Para a lisozima, o efeito do aumento da concentração salina causou redução nos valores de segundo coeficiente virial calorimétrico, indicando o fenômeno de *salting out*, no qual há redução da solubilidade com o aumento da concentração salina. O efeito do pH para ambas as proteínas foi regido pelo distanciamento do ponto isoelétrico das proteínas, de forma que, em pHs mais próximos ao ponto isoelétrico, o segundo coeficiente virial apresentou menores valores, indicando menor solubilidade. Esta relação indica que o parâmetro obtido neste estudo representa as interações intermoleculares da proteína. Desta forma, foi possível validar a calorimetria de titulação isotérmica como ferramenta para avaliação da solubilidade de proteínas.

Palavras-chave: ITC; coeficiente virial; interações intermoleculares; cristalização; BSA; lisozima.

ABSTRACT

The current study aimed to apply the isothermal titration calorimetry in the evaluation of intermolecular interactions between proteins. Thus, it was obtained the calorimetric second virial coefficient, which is related to the second virial coefficient, representing the deviation from the ideal behavior of real solutions. It is known that the second virial coefficient is an important tool for the understanding of industrial processes of separation of biomolecules, such as crystallization and precipitation. The methodology applied to the isothermal titration calorimeter resulted in the obtaining of the dilution heat of the proteins bovine serum albumin and lysozyme under the influence of different experimental conditions. From this it was obtained the calorimetric second virial coefficient. The effect of pH (4.6, 5.4 and 7.4 for bovine serum albumin, 4.6 and 7.0 for lysozyme) was evaluated, as well as the concentration of sodium chloride as crystallization agent (0.0 mol L⁻¹ to 0.5 mol L⁻¹ for both proteins) on the values of the calorimetric second virial coefficient. In the final comparative analysis, it was observed the strong influence of pH and ionic strength of the molecular interaction. For bovine serum albumin, the effect of increasing the salt concentration led higher values of calorimetric second virial coefficient, as expected by *salting in* phenomenon, wherein the solubility is increased according to the addition of salts in the solution. For lysozyme, the effect of increasing the salt concentration caused a reduction in the values of calorimetric second virial coefficient indicating the *salting out* phenomenon, wherein the solubility is decreased with increasing salt concentration. Regarding the effect of pH for both proteins, it is ruled by the distance from the protein's isoelectric point, so as closer to the isoelectric point, the second virial coefficient adopted the lowest values, indicating decreasing in solubility. This relation indicated that the parameter obtained in this study represents the proteins's intermolecular interactions. Thus, it was possible to validate the isothermal titration calorimetry as a tool for protein solubility evaluation.

Keywords: ITC; virial coefficient; intermolecular interaction; crystallization; BSA; lysozyme.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 RESUMO DA CLASSIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES.	28
FIGURA 3.2. PAR POTENCIAL DE GÁS IDEAL.	29
FIGURA 3.3. POTENCIAIS REPULSIVOS (ESFERA DURA À ESQUERDA, E POWER-LAW POTENTIAL E EXPONENCIAL À DIREITA; b) PAR POTENCIAL TOTAL OBTIDO PELA ADIÇÃO DA PARCELA ATRATIVA. SABE-SE QUE R É A DISTÂNCIA ENTRE AS MOLÉCULAS E ÁTOMOS E Σ É O RAIO MOLECULAR OU ATÔMICO.	31
FIGURA 3.4. DADOS DE SLS PARA BSA EM 50 mmol L ⁻¹ DE TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO, pH 6,5 E 298K COM (a) 20, (b) 37, (c) 52, (d) 60% (v/v) DE SULFATO DE AMÔNIO.	38
FIGURA 3.5. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS POR ANO RELATANDO CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DE 1971 A 2015.	39
FIGURA 3.6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CALORÍMETRO DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.	41
FIGURA 3.7. CURVAS TÍPICAS OBTIDAS DA ANÁLISE DE ITC. a) DADOS BRUTOS: FLUXO DE CALOR EM FUNÇÃO DO TEMPO; b) GRÁFICO OBTIDO APÓS O TRATAMENTO DOS DADOS BRUTOS: INTEGRAL DE CADA PICO EM FUNÇÃO DA RAZÃO MOLAR.	42
FIGURA 3.8. CURVAS OBTIDAS DA ANÁLISE DE ITC PARA A ENTALPIA DE DILUIÇÃO.	42
FIGURA 4.1. DILUIÇÃO DE UMA AMOSTRA DE ÁGUA PURA SOBRE ELA MESMA POR ITC.	49
FIGURA 5.1. CURVAS DE ITC (TRIPLICATA) PARA A TITULAÇÃO DE SOLUÇÃO PROTEICA DE BSA EM SOLUÇÃO TAMPÃO, COM 0,10 mol L ⁻¹ DE NaCl A pH 5,4.	53
FIGURA 5.2. ILUSTRAÇÃO DA SUBTRAÇÃO DE DADOS DE REFERÊNCIA (ESQUERDA) DOS DADOS DO ENSAIO (CENTRO),	

RESULTANDO EM DADOS REAIS (DIREITA), CUJOS PICOS GERAM A CURVA DE DADOS TRATADOS.	53
FIGURA 5.3. VARIAÇÃO DE CALOR DE DILUIÇÃO MOLAR OBTIDA PARA BSA NO ITC.	54
FIGURA 5.4. VARIAÇÃO DE CALOR DE DILUIÇÃO MOLAR OBTIDO PARA LISOZIMA NO ITC.	55
FIGURA 5.5. EFEITO DO pH SOBRE OS VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A BSA.	60
FIGURA 5.6. EFEITO DO pH SOBRE OS VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A LISOZIMA.	62
FIGURA 5.7. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE O SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A BSA.	65
FIGURA 5.8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE OS VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A LISOZIMA.	66
FIGURA 5.9. EFEITO DO pH SOBRE O SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) DA BSA PARA NaCl E $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.	69
FIGURA 5.10. DADOS DE SOLUBILIDADE (S, EM mg/mL) EM FUNÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL (B) PARA A LISOZIMA.	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. FUNÇÕES POTENCIAIS.	30
TABELA 3.2. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL COM ALGUMAS DE SUAS VANTAGENS E DESVANTAGENS.	36
TABELA 3.3. ALGUMAS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDO DE INTERAÇÕES MOLECULARES.	40
TABELA 5.1. VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2 , mL) PARA BSA SOB VÁRIAS CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÕES DE NaCl, OBTIDOS POR ITC, a 25°C.	57
TABELA 5.2. VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2 , mL) PARA LISOZIMA SOB VÁRIAS CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÕES DE NaCl, OBTIDOS POR ITC.	57

LISTA DE SIGLAS

SLS	Espalhamento de luz polarizada
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SANS	Espalhamento de nêutrons a baixo ângulo
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
pI	Ponto Isoelétrico, ou pH isoeletrico
BSA	Albumina de soro bovino
SPR	Ressonância de plasma de superfície
AUC	Ultracentrifugação analítica
NMR	Ressonância magnética nuclear
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

B_{22}	Segundo coeficiente virial, ou segundo coeficiente virial osmótico
μ	Força iônica
Z	Valência do íon; fator de compressibilidade; carga líquida da superfície da proteína
C	Concentração molar do íon; concentração mássica do soluto
F	Força eletrostática
q	Carga do íon
ε	Constante dielétrica; coeficiente de extinção
r	Distância entre dois íons; raio interatômico
$w(r)$	Par potencial total
n	Número de moléculas; número de mols de proteína
σ	Diâmetro intemolecular
c, σ_0	Constante ajustável do par potencial
R	Constante dos gases ideais
P	Pressão
v	Volume
T	Temperatura
Π	Pressão osmótica
K	Constante ótica
R_θ	Limite de Rayleigh
M	Massa molar da proteína
E	Variação de energia
N	Número de moléculas de proteína; número de estequiometria da ligação
k_B	Constante de Boltzmann

ρ	Densidade de moléculas na solução
b_2	Segundo coeficiente virial calorimétrico
H	Entalpia
S	Entropia
G	Energia livre de Gibbs
K_a	Constante de associação
ΔH	Variação de entalpia
ΔV	Variação de volume
Q_{Dil}	Calor de diluição
Φ_w	Fração de água por volume de solução
$\Delta W, dW$	Variação de trabalho
$\Delta Q, dQ$	Variação da quantidade de calor
$\Delta U, dU$	Variação da energia interna
U	Energia interna

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS	20
3.1.1 INFLUÊNCIA DO PH	21
3.1.2 INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA (μ)	22
3.1.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	23
3.1.4 INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES ORGÂNICOS	23
3.2 PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS DE ESTUDO	24
3.2.1 ALBUMINA DE SORO BOVINO	24
3.2.2 LISOZIMA DE CLARA DE OVOS DE GALINHA	25
3.3 INTERAÇÕES MOLECULARES	26
3.3.1 TIPOS DE INTERAÇÃO	26
3.3.2 PAR POTENCIAL TOTAL ($w(r)$)	28
3.4 PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	31
3.4.1 PRECIPITAÇÃO	32
3.4.2 CRISTALIZAÇÃO	33
3.5 SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL (B_{22})	34
3.6 CORRELAÇÃO ENTRE B_{22} E A CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	38
3.7 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)	39
3.8 USO DA CALORIMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL DE PROTEÍNAS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	45
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PROTEICAS	46
4.3 OBTENÇÃO DA ENTALPIA DE DILUIÇÃO POR ITC	46
4.4 OBTENÇÃO DO CALOR DE DILUIÇÃO	47
4.5 CORRELAÇÃO DO CALOR DE DILUIÇÃO COM O SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 AVALIAÇÃO DO CALOR DE DILUIÇÃO OBTIDO POR ITC	52
5.2 DETERMINAÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO	57
5.2.1 EFEITO DO PH SOBRE B_2	59
5.2.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SALINA SOBRE B_2	64
5.2.3 EFEITO DA ESPÉCIE SALINA	68
5.3 RELAÇÃO ENTRE SOLUBILIDADE E B_2	70

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	73
6.1 CONCLUSÕES	73
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE 1	82
APÊNDICE 2	91
APÊNDICE 3	96

1. INTRODUÇÃO

Os avanços do conhecimento na biotecnologia têm promovido a modernização de processos industriais e a aplicação de novas tecnologias nas áreas agro alimentícia, química e farmacêutica, que tem buscado cada vez mais utilizar biomoléculas especializadas em seus processos.

Um exemplo desses avanços é a utilização de enzimas. Esse grupo de proteínas atualmente é utilizado em diversos produtos e tratamentos, sendo aplicado em panificação, produtos cárneos, clarificação de sucos, medicamentos para neutralizar intolerâncias alimentares, remoção de manchas (por adição a produtos de limpeza), tratamento de tecidos e couro, tratamento de efluentes, entre muitas outras aplicações nas mais variadas áreas.

Para a utilização das biomoléculas com fins industriais ou analíticos muitas vezes é necessário que a pureza seja elevada, apresentando a menor quantidade de interferentes possível. Para isso, são empregadas operações para separação e purificação (*downstream*). Alguns dos métodos tradicionais são a cromatografia e a eletroforese, mas, quando se trabalha com grandes volumes de solução para processamento, são pouco viáveis. Há também a precipitação por ponto isoelétrico. Contudo, algumas proteínas são solúveis no pH isoelétrico, além de haver geração de resíduos químicos nesta operação.

Um processo de *downstream* de proteínas com grande potencial para utilização industrial é a cristalização. Os cristais formados podem ser separados da solução por operações unitárias simples, como centrifugação ou filtração, além de possuírem alto grau de pureza e estabilidade, o que implica no aumento do período de validade.

A cristalização de proteínas está relacionada com as forças intermoleculares presentes no meio. Ao modificá-las, aumentando as forças atrativas e reduzindo as repulsivas através da alteração das condições de pH, temperatura e força iônica, entre outras, é possível induzir este fenômeno. Contudo, as condições ideais para promover a cristalização em sistemas proteicos ainda não foram completamente elucidadas na literatura e ainda há muito a se pesquisar sobre os processos de separação e purificação de proteínas para que sejam considerados satisfatórios.

Uma forma de conhecer as interações intermoleculares da solução é por meio das equações de estado para soluções reais. Existem diversas equações na literatura para este fim. Contudo, a que será utilizada neste estudo é a equação virial, que tem significância física. Nela está contido o parâmetro que representa as forças intermoleculares mais significativas no distanciamento da solução do comportamento ideal: o segundo coeficiente virial (B_{22}).

Para projetar e operar processos de cristalização e precipitação de proteínas é de grande utilidade conhecer o segundo coeficiente virial. Ao quantificar as interações moleculares mais relevantes nas soluções proteicas é possível estabelecer as melhores condições do meio para que as moléculas de proteína tenham sua solubilidade reduzida. Nesta situação as interações atrativas entre as moléculas prevalecem sobre as repulsivas, resultando na agregação proteica e separação da solução. O B_{22} pode ser relacionado com a solubilidade por meio de modelos teóricos e empíricos que constam na literatura.

Além disso, é importante conhecer as interações intermoleculares quando se tem por objetivo estabilizar a proteína na solução, evitando coagulações indesejadas, de forma a garantir a qualidade do produto. Neste caso, as interações repulsivas entre as proteínas prevalecem, bem como as interações entre a proteína e o solvente.

Em grande parte dos relatos da literatura, o B_{22} de proteínas foi obtido pelos métodos tradicionais, que incluem osmometria de membranas, espalhamento de luz polarizada (SLS e DLS), espalhamento de raios-X ou nêutrons (SAXS e SANS) e cromatografia (por exclusão ou auto interação). Foi encontrado na literatura um número reduzido de trabalhos que utilizaram (para este fim) a mesma técnica que está sendo avaliada neste trabalho: a calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

A técnica de ITC é muito útil no estudo das interações moleculares, sendo utilizada para monitorar alterações termodinâmicas provocadas por atividade de enzimas, interações e ligações, entre outras reações. Uma das vantagens de utilizar esta técnica é que a entalpia é medida ao invés de calculada. E por meio desta informação, adicionada à estequiometria da reação e à afinidade química (também determinadas pela técnica), torna-se possível calcular a energia livre de Gibbs, relacionada à espontaneidade dos processos químicos, e a diferença de entropia, relacionada ao grau de ordem do sistema, fornecendo o perfil termodinâmico da interação.

Buscou-se neste projeto empregar a técnica de ITC como método alternativo para obtenção do segundo coeficiente virial (b_2) de proteínas, permitindo melhorar a compreensão do fenômeno de cristalização.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Determinar o segundo coeficiente virial calorimétrico de proteínas empregando a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) como técnica alternativa aos métodos tradicionais para a obtenção deste parâmetro.

2.2 Objetivos específicos

- Obter no ITC a entalpia e o calor de diluição das soluções proteicas de albumina bovina sérica e lisozima;
- Correlacionar o calor de diluição com o segundo coeficiente virial calorimétrico;
- Correlacionar o segundo coeficiente virial calorimétrico com as interações moleculares e com a solubilidade;
- Validar a metodologia comparando com a literatura a relação entre o segundo coeficiente virial calorimétrico (b_2), obtido neste projeto, e o segundo coeficiente virial osmótico (B_{22}), da literatura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão abordados a solubilidade de proteínas, os processos de downstream, o segundo coeficiente virial, os métodos de estudo de interações moleculares e a relação entre estes conceitos, bem como o princípio e o funcionamento da titulação calorimétrica isotérmica, as características físico-químicas e o estado da arte das proteínas estudadas neste trabalho.

3.1 Solubilidade de proteínas

As proteínas podem ser encontradas solubilizadas, cristalizadas ou precipitadas. De acordo com Fennema et al. (2010), a solubilidade das proteínas está intimamente ligada aos seus estados estruturais. Portanto, é um parâmetro utilizado industrialmente para medir o estado de desnaturação durante os processos de extração, isolamento e purificação. As propriedades funcionais das proteínas podem ser afetadas por suas características de solubilidade. Isso significa que esta propriedade também pode ser usada como um índice das potenciais aplicações industriais das proteínas.

A solubilidade é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente. Quando as interações proteína-solvente são maiores significa que as interações iônicas são mais intensas que as interações hidrofóbicas e a solubilidade da proteína é maior. No entanto, quando as interações proteína-proteína são maiores há redução da solubilidade devido a predominância de interações hidrofóbicas, podendo haver precipitação ou cristalização. Por ter esta dinâmica, a solubilidade é um processo de equilíbrio que pode ser afetado por diversos fatores (SILBERBERG, 2009).

As proteínas globulares têm uma superfície topográfica assimétrica, com grupos polares e apolares. A localização de cada um desses grupos é uma característica única e determina a atividade de superfície e a solubilidade da proteína (YAMPOLSKAYA; PLATIKANOV, 2007).

Para cristalizar uma biomolécula em um solvente é preciso submeter a solução a um estado de saturação. Proteínas apresentam peculiaridades, uma vez que as interações necessárias para solubilizá-las num solvente podem ser competitivas com as interações intermoleculares, que são responsáveis pela estrutura tridimensional da macromolécula, devido à sua similaridade (AZEVEDO JR., 2004).

De acordo com Fennema et al. (2010), além das propriedades físico-químicas naturais das proteínas (relacionadas a sua conformação, resíduos iônicos e interações entre cadeias polipeptídicas e monômeros das proteínas), há diversos fatores das soluções em que estão contidas que alteram sua solubilidade, podendo promover sua separação. Industrialmente, este evento pode ser desejável, como no caso de processos de *downstream* (separação e purificação) de proteína e enzimas, ou indesejável, como para processamento de leite, pães e produtos cárneos, entre outros, nos quais a proteína solubilizada no produto e confere a ele propriedades características.

Na sequência serão apresentados os principais fatores envolvidos na solubilização de proteínas.

3.1.1 Influência do pH

A solubilidade mínima das proteínas ocorre no pH isoelétrico, ou ponto isoelétrico (pI). Nesse estado, a carga líquida da superfície da proteína é zero e, devido à falta de repulsões eletrostáticas, predominam as interações hidrofóbicas. Desta forma, as proteínas tendem à agregação e à precipitação (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

No ponto isoelétrico as interações com o solvente são mínimas, assim como a interação entre as proteínas. Isso não significa que elas sejam nulas, pois há proteínas, como a albumina de soro bovino (BSA), que são altamente solúveis mesmo no ponto isoelétrico. Essas proteínas têm na superfície uma quantidade de resíduos hidrofílicos muito superior à de resíduos hidrofóbicos (apolares) e apesar de eletricamente neutra, a proteína ainda apresenta um número de cargas positivas e negativas na superfície de forma que a hidrofilicidade ainda é maior que a hidrofobicidade (FENNEMA et al., 2010).

A carga líquida das proteínas pode ser positiva, caso o pH esteja abaixo do pH isoelétrico da proteína, quando há abundância de íons H^+ em solução, ou negativa, quando o pH está acima do pH isoelétrico (quando a quantidade de íons H^+ em solução é menor) (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

É relevante frisar que o tratamento térmico modifica o perfil de solubilidade-pH, pois o calor promove a desnaturação proteica, ou seja, o desdobramento das cadeias, aumentando significativamente a exposição das cadeias hidrofóbicas na superfície, reduzindo a solubilidade da proteína (FENNEMA et al., 2010).

3.1.2 Influência da força iônica (μ)

A força iônica (μ) é um parâmetro da solução que pode ser modificada com a adição de sais iônicos, de diferentes naturezas e concentrações, na solução. A variação da solubilidade das proteínas sob diferentes concentrações salinas é o resultado das interações eletrostáticas e hidrofóbicas que ocorrem no meio (AZEVEDO JR., 2004).

A força iônica (μ , mol L⁻¹) é definida em função da concentração (C , mol L⁻¹) e da valência (Z) do íon i presente no sal adicionado à solução (Equação 3.1.).

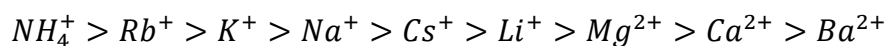
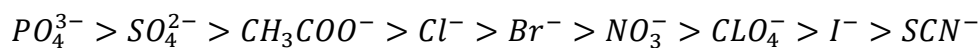
$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad 3.1$$

Sob forças iônicas baixas (<0,5 mol L⁻¹), o aumento da solubilidade da proteína que acontece devido às interações eletrostáticas não específicas entre a proteína (macromolécula carregada) e as espécies iônicas do sal é chamado de *salting-in*. Outra forma de tratar este fenômeno é considerá-lo como resultado da competição entre grupos carregados da superfície da proteína e íons em solução. A água ligada aos íons aumenta a solvatação das proteínas (AZEVEDO JR., 2004; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Quando a força iônica aumenta a solubilidade é reduzida devido ao aumento das interações hidrofóbicas entre as proteínas. Em moléculas com alta incidência de trechos não polares na superfície ocorre a exclusão preferencial do íon e a solubilidade diminui devido ao aumento das interações hidrofóbicas e redução das interações hidrofílicas (com o solvente). Este fenômeno consiste no *salting out* e é um meio muito utilizado para precipitar proteínas (AZEVEDO JR., 2004; FENNEMA et al., 2010).

Contudo, não é a concentração salina na solução que afeta a solubilidade. A natureza do sal utilizado também tem expressiva relevância. Em 1888, Hofmeister relatou uma série na qual são ordenados ânions e cátions de acordo com seus efeitos na solubilidade das proteínas. Foram chamados de liotrópicos os íons que têm capacidade de promover interações hidrofóbicas, reduzindo a solubilidade, e de caotrópicos os íons que perturbam as interações hidrofóbicas, aumentando a solubilidade. Porém, a forma como este fenômeno ocorre ainda é controversa (RIES-KAUTT; DUCRUIX, 1989; MCCUE, 2014).

A Série de Hofmeister está listada a seguir para ânions e cátions, respectivamente, em ordem decrescente de força de interação, da esquerda para a direita.



Os dois sais liotrópicos mais comuns são o sulfato de amônio – $(NH_4)_2SO_4$ – e o cloreto de sódio – $NaCl$.

3.1.3 Influência da temperatura

Considerando força iônica e pH constantes, assim como para sólidos cristalinos, a temperatura aumenta a solubilidade das proteínas, com exceção de moléculas altamente hidrofóbicas, como a β -caseína. Contudo, este acréscimo na solubilidade ocorre apenas na faixa de 0 a 40°C (SILBERBERG, 2009; FENNEMA et al., 2010).

Em temperaturas superiores a 40°C, o aumento excessivo de energia do sistema causa a desnaturação proteica, ou seja, o desdobramento da estrutura nativa e consequentemente, a exposição de grupos não polares, que se agregam e precipitam, reduzindo a solubilidade (FENNEMA et al., 2010).

3.1.4 Influência dos solventes orgânicos

A adição de solventes orgânicos a soluções proteicas reduz a solubilidade das proteínas. Para explicar este fenômeno, é preciso avaliar a definição matemática da força de atração entre dois íons – força eletrostática (F) – que é dada pela Equação 3.2.

$$F = \frac{q_1 q_2}{\varepsilon r^2} \quad 3.2$$

Em que q_1 e q_2 são a carga dos íons, podendo ser positivos ou negativos, diferentemente de ε , constante dielétrica do meio, particular de cada solvente, e de r , distância entre os dois íons. Quando F é positivo, significa que as cargas q_1 e q_2 têm o mesmo sinal, portanto, há repulsão. Se F é negativo, q_1 e q_2 têm sinais opostos, gerando atração (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

A constante dielétrica da água a 20°C é aproximadamente 4 vezes maior que a do etanol, que também é um solvente polar, que pode ser utilizado no preparo de soluções. Assim como o etanol, os demais solventes orgânicos têm constante dielétrica inferior à da água. Isso significa que ao utilizar um solvente orgânico na preparação de uma solução aquosa de proteína, a constante dielétrica do meio será reduzida e, conseqüentemente, as forças eletrostáticas intra e intermoleculares aumentarão, tanto repulsivas quanto atrativas. O aumento das forças eletrostáticas repulsivas gera desdobramento da molécula de proteína. Esta condição da molécula, aliada à baixa constante dielétrica do meio, promove a ligação intermolecular atrativa entre grupos de cargas opostas e a ligação de hidrogênio entre grupos peptídicos expostos de outras moléculas de proteína desdobradas. O resultado dessas interações é a agregação de moléculas de proteína e a precipitação (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007; FENNEMA et al., 2010).

3.2 Propriedades das proteínas de estudo

Foram utilizadas neste estudo a lisozima e a albumina de soro bovino devido à maior quantidade de informações bioquímicas e de segundo coeficiente virial disponíveis na literatura, obtidos por métodos tradicionais.

3.2.1 Albumina de soro bovino

A albumina sérica é a proteína majoritária do plasma sanguíneo e também pode ser encontrada em menores quantidades nos tecidos de animais e nas secreções. Uma característica importante desta proteína é sua capacidade de se ligar às mais diversas substâncias, como ácidos graxos, fármacos e íons de cloro, entre outras (HAUROWITZ, 1963; BARONE et al., 1992)

Por conta de suas características, a albumina de soro, de diversas fontes, tem apresentado grande aplicação industrial e biomédica. Além disso, suas propriedades têm sido cada vez mais estudadas e exploradas no meio científico (HUANG et al., 2004).

A albumina de soro bovino (BSA) tem sua estrutura muito semelhante à albumina sérica humana (HSA). Cerca de 80% da sequência de aminoácidos nas duas

proteínas é idêntica, o que contribuiu para que a BSA se tornasse extensivamente estudada (HUANG et al., 2004; JHA; KISHORE, 2011).

Esta proteína tem massa molar próxima a 66kDa, e é formada por uma única cadeia polipeptídica com 583 resíduos que, devido à grande quantidade de grupos carregados hidrofílicos em sua superfície, conferem à BSA um ponto isoelétrico em torno do pH 4,7 (SIGMA-ALDRICH INC.; HAUROWITZ, 1963; FENNEMA et al., 2010; MA et al., 2015).

A quantidade de estudos do segundo coeficiente virial da BSA é razoavelmente limitada, mas esta proteína foi utilizada por George & Wilson (1994) na elaboração de sua pesquisa notável, que relaciona o segundo coeficiente virial de diversas proteínas com a solubilidade.

Na literatura, há estudos sobre o segundo coeficiente virial da BSA obtidos por SLS (GEORGE; WILSON, 1994; BAJAJ et al., 2004; SU et al., 2008; YADAV et al., 2011; ZHANG et al., 2012; MA et al., 2015), por osmometria de membranas (SHAW, 1976; VILKER et al., 1981; WU; PRAUSNITZ, 1999; MOON et al., 2000^b; LU et al., 2009; PARK; CHOI, 2009; MCBRIDE; RODGERS, 2013), reflexão fluorescente total interna (ASANOV et al., 1997) e modelos teóricos (LI; HUANG, 2013). Não foram encontrados relatos da obtenção deste parâmetro termodinâmico por ITC para a BSA.

Os trabalhos com técnicas que envolvem soluções usam, na grande maioria, o sal cloreto de sódio para controlar a força iônica, havendo também relatos do uso de outros sais, como cloreto de potássio, cloreto de lítio (PARK; CHOI, 2009), e sulfato de amônio (LU et al., 2009).

3.2.2 Lisozima de clara de ovos de galinha

Presente em secreções corporais, tecidos de organismos humanos e animais, a lisozima é uma proteína com aplicações limitadas na indústria. No entanto, é uma proteína modelo muito estudada no meio científico e bem definida na literatura.

Formada por uma cadeia polipeptídica única com 129 resíduos, é uma proteína com uma fração hidrofóbica alta, com ponto isoelétrico igual a 11,4. Com massa molecular de 14 kDa, a lisozima desnatura a 72°C e atua como uma enzima, sendo capaz de hidrolisar carboidratos de alto peso molecular (NELSON; COX, 2002; SIGMA-ALDRICH INC., 2008; FENNEMA et al., 2010)

Há uma série de informações sobre o segundo coeficiente virial da lisozima, já que ela é uma proteína modelo. Além disso a lisozima foi utilizada por George & Wilson (1994), Guo et al. (1999), Franco & De Pessôa Filho (2013), Haas et al. (1999) e Ruppert et al (2001) na elaboração de seus modelos, que relacionam o segundo coeficiente virial e a solubilidade de proteínas.

O segundo coeficiente virial da lisozima já foi obtido por SLS (GEORGE; WILSON, 1994; VELEV et al., 1998; NARAYANAN; LIU, 2003; LIU et al., 2004; BAJAJ et al., 2004; ASTHAGIRI et al., 2005; DESZCZYNSKI et al., 2006; MEDEIROS, 2013), por osmometria de membranas (MOON et al., 2000^a; MOON et al., 2000^b; PARK; CHOI, 2009; MCBRIDE; RODGERS, 2013; MEDEIROS, 2013) e por cromatografia de auto interação (TESSIER et al., 2002; DUMETZ et al., 2008).

3.3 Interações moleculares

Para entender os fenômenos de agregação de proteínas é necessário conhecer com mais especificidade quais são as interações moleculares presentes nas soluções e como elas ocorrem. A partir desses conhecimentos é possível induzir os processos de separação e purificação.

3.3.1 Tipos de Interação

Quando duas moléculas se aproximam, elas interagem com o intuito de atingir o estado termodinâmico com menor energia e, conseqüentemente, maior estabilidade. As interações que podem acontecer são covalentes, ou seja, com compartilhamento de elétrons, e não covalentes, sem compartilhamento de elétrons (SMITH, 2009).

As interações não covalentes são muito importantes nos fluidos reais, tanto para ligações intramoleculares, quanto intermoleculares. Por não envolverem compartilhamento de elétrons, estas são interações fracas e ocorrem devido à presença de partículas carregadas (íons) com cargas positivas e negativas, que provocam as chamadas forças eletrostáticas. A intensidade com que essas interações ocorrem está diretamente relacionada com a distância entre as moléculas envolvidas (SILBERBERG, 2009).

As forças de van der Waals são um conjunto de ligações não covalentes. São interações eletrostáticas já que acontecem em dipolos e/ou íons com cargas opostas e não provocam ligação entre moléculas, mas interação. As forças de van der Waals consistem em: íon-dipolo, dipolo induzido, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e forças de dispersão (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A interação íon-dipolo acontece quando se tem uma molécula carregada (íon) próxima a uma molécula polar. O íon irá atrair uma parte da molécula polar (a parte com carga oposta à sua própria), e repelir a outra parte (com mesma carga que a sua) (ISRAELACHVILI, 2011).

Entre duas moléculas polares ocorre a interação dipolo-dipolo, em que a parte positiva da molécula atrai a parte negativa da outra e repele a parte negativa. Da mesma forma ocorre com a parte carregada positivamente: interage com outra molécula atraindo a parte negativa e repelindo a positiva (SILBERBERG, 2009).

Quando o hidrogênio de uma molécula (eletropositiva) interage com algum elemento pequeno e muito eletronegativo (fósforo, oxigênio ou nitrogênio) de outra molécula, uma interação dipolo-dipolo muito forte acontece. Essa interação é chamada de ligação de hidrogênio e tem expressiva relevância para os sistemas biológicos (SEMENOVA; DICKINSON, 2010).

O dipolo induzido ocorre entre uma molécula polar e uma apolar. A carga da primeira provoca uma alteração na configuração eletrônica da segunda, gerando um dipolo (PRAUZNITZ et al., 1999).

Por fim, a interação que ocorre entre moléculas apolares é decorrente da força de dispersão que ocorre quando há oscilações momentâneas na carga elétrica dos átomos. Neste momento ocorre um dipolo instantâneo, que na sequência provoca um dipolo instantâneo no átomo vizinho, e assim por diante. Esta é a interação de van der Waals mais fraca (SILBERBERG, 2009). O resumo dessas interações encontra-se diagramado na FIGURA 3.1.

Outro tipo importante de interação não covalente que ocorre em proteínas são as interações hidrofóbicas, que são induzidas pela estrutura da água entre grupos não polares. Esta interação é responsável pelo dobramento das proteínas em estruturas terciárias e também desempenha um papel importante nas interações proteína-proteína (FENNEMA et al., 2010; CHANPHAI et al., 2015).

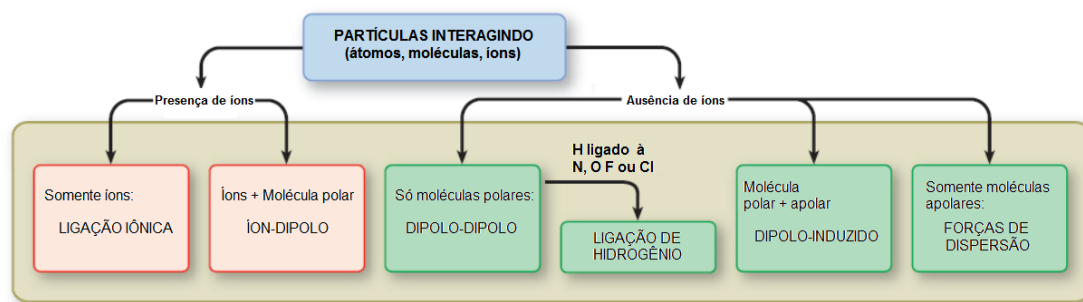


FIGURA 3.1 RESUMO DA CLASSIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES.
FONTE: Adaptado de Sonntag et al. (2009).

As interações de van der Waals são muito fracas e diminuem com o aumento da distância intermolecular. Porém, nas proteínas, estas interações têm uma contribuição muito significativa para os dobramentos e a estabilidade, já que os pares de átomos que interagem desta forma são numerosos (FENNEMA et al., 2010).

3.3.2 Par potencial total ($w(r)$)

Segundo Israelachvili (2011), quando duas nuvens eletrônicas se aproximam, uma força repulsiva intensa ocorre devido à sobreposição de seus átomos. Esta força determina o quão longe os átomos/moléculas devem ficar, sendo inversamente proporcional à distância entre eles.

Para descrever esta força e a sua relação com a distância intermolecular não há uma equação geral. Como alternativa, algumas funções empíricas de par potencial ($w(r)$) surgiram.

O caso mais inteligível, segundo Prauznitz et al (1999), é o do par potencial de gás ideal. Ele assume que $w(r)=0$ para qualquer valor de distância intermolecular, conforme é possível observar na FIGURA 3.2.

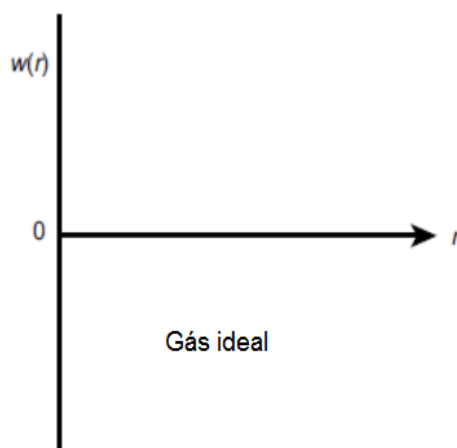


FIGURA 3.2. PAR POTENCIAL DE GÁS IDEAL.

FONTE: Adaptado de Prauznitz *et al.* (1999).

Em seguida, tem-se as funções relativas à repulsão. As mais comuns são os potenciais de esfera dura, da lei de potência e exponencial (do inglês, *hard sphere potential*, *power-law potential* e *exponential potential*, respectivamente). Quando os átomos podem ser aproximados a esferas duras (incompressíveis), as forças repulsivas se tornam infinitas em certa distância atômica. Este modelo reflete o comportamento de átomos e moléculas em estado líquido ou sólido – esferas duras ou “bolas de bilhar” não atrativas, ou seja, com raio fixo e característico de cada molécula. Esta função está descrita na Equação 3.3.

$$w(r) = +(\sigma/r)^n \quad \text{onde } n \rightarrow \infty \quad 3.3$$

O número de moléculas é representado por n , r é o raio ou distância interatômica e σ é o diâmetro molecular característico dos átomos e moléculas. Enquanto a distância entre os átomos será maior que o diâmetro molecular, a repulsão é zero. Mas, quando o diâmetro molecular é maior que a distância entre as moléculas, a repulsão tende ao infinito (ISRAELACHVILI, 2011).

Outras duas funções potenciais citadas, lei da potência e exponencial, estão representadas nas Equações 3.4 e 3.5, respectivamente. Essas são funções mais realísticas, pois não consideram o átomo ou a molécula incompressíveis.

$$w(r) = +(\sigma/r)^n \quad 3.4$$

$$w(r) = +ce^{-r/\sigma_0} \quad 3.5$$

Em que c e σ_0 são constantes ajustáveis. Essas funções definem a repulsão ocorrendo de forma menos abrupta que o potencial de esfera dura.

Quando se adiciona na função de par potencial repulsiva uma parte relativa à atração (que precede a repulsão), tem-se o par potencial total. Na FIGURA 3.3 é possível observar o efeito da adição da parcela atrativa no par potencial repulsivo, sabendo que $w(r) > 0$ gera força resultante repulsiva, e $w(r) < 0$ gera força resultante atrativa (PRESS et al., 1965).

Várias funções potenciais já foram elaboradas para as mais diferentes situações. Na TABELA 3.1 estão colocadas algumas das funções potenciais totais (que consideram atração e repulsão) e onde cada uma delas se aplica.

TABELA 3.1. FUNÇÕES POTENCIAIS.

Nome/Tipo	Função	Situação de aplicação
Lennard-Jones	$-\frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}}$	Átomos e pequenas moléculas
Sutherland ($m=\infty$)	$-\frac{A}{r^n} + \frac{B}{r^m}, m > n$	Átomos, íons e pequenas moléculas; ligações físicas e químicas
Poço quadrado	$w(r) = \infty$ com $r < \sigma$ $w(r) = \text{constante} = -w_0$ $\sigma < r < r_0$ $w(r) = 0$ com $r > r_0$	Interações entre moléculas grandes; Ligações em polímeros
Esfera dura de Coulomb ^a	$-(A/r) + (\sigma/r)^n, n \rightarrow \infty$	Interações íon-íon no vácuo

^a Formas especiais do potencial de Mie.

FONTE: Adaptado de Israelachvili (2011).

O estudo das forças moleculares e dos diversos modelos de interação é essencial para conhecer o comportamento das soluções reais. No entanto, para ir mais a fundo nesta questão, é preciso voltar a atenção para os conceitos da termodinâmica estatística, o que não representa o objetivo deste estudo.

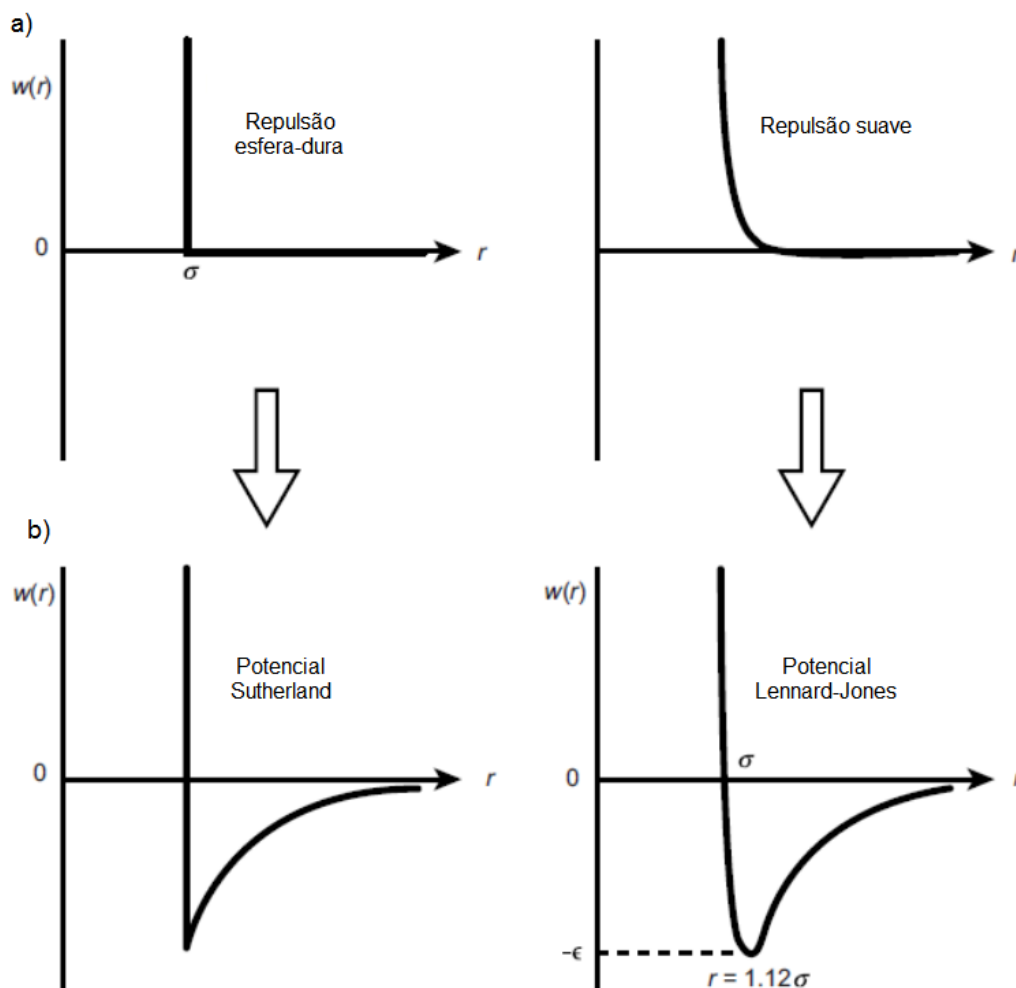


FIGURA 3.3. POTENCIAIS REPULSIVOS (ESFERA DURA À ESQUERDA, E POWER-LAW POTENTIAL E EXPONENCIAL À DIREITA; b) PAR POTENCIAL TOTAL OBTIDO PELA ADIÇÃO DA PARCELA ATRATIVA. SABE-SE QUE r É A DISTÂNCIA ENTRE AS MOLÉCULAS E ÁTOMOS E σ É O RAIO MOLECULAR OU ATÔMICO.

FONTE: Adaptado de Israelachvili (2011).

3.4 Processos de purificação de proteínas

Gordon et al. (1990) categorizou técnicas e processos de purificação de proteínas potencialmente bem sucedidos na indústria em três grandes áreas, separando-os por princípio de funcionamento: processos de adsorção e cromatografia, eletroforéticos e extrativos. Os fatores dominantes para utilização de cada método é o grau de

resolução/purificação, a capacidade de operar com alimentações com partículas e a complexidade mecânica do processo.

Para decidir qual o melhor processo de purificação a ser utilizado é desejável que a relação custo/benefício seja boa (para muitas proteínas, o custo de extração e purificação deve se manter baixo para torná-las competitivas), baixo tempo de processo (para minimizar as reações de degradação) e uma mecânica simples (GORDON et al., 1990).

Embora a maior parte dos processos de separação utilizados sejam cromatográficos, existe grande interesse em desenvolver métodos alternativos que possam reduzir o custo com equipamentos, aumentar produtividade, aumentar a flexibilidade dos processos e melhorar a qualidade (ZYDNEY, 2016).

Neste contexto surge a necessidade de aperfeiçoar processos alternativos, como a precipitação e a cristalização.

3.4.1 Precipitação

Titchener-Hooker et al. (2008) relatam que a precipitação de proteínas não estava sendo utilizada no tratamento de bioprodutos farmacêuticos, mas que devido à necessidade de se gerenciar títulos muito elevados de biomoléculas (alcançados em processos de fermentação e de culturas de células) aliada à dificuldade de utilizar os métodos tradicionais (cromatográficos) para maior escala, o interesse neste tipo de técnica pode mudar. Contudo, os relatos de Zydney (2016) afirmam que as técnicas cromatográficas ainda são as mais utilizadas, de forma que os avanços no estudo da precipitação ainda são insuficientes para aplicação em larga escala.

A precipitação é uma técnica utilizada para concentrar e, por vezes, dessalinizar proteínas. Para promover este processo é preciso alterar a solubilidade da proteína por adição de reagentes, como solventes orgânicos, sais iônicos, polímeros hidrofílicos, íons metálicos polivalentes, ou por adição de ácidos ou bases para atingir o pI. Vários desses métodos podem resultar na desnaturação da proteína (reversível ou não, variando de acordo com o método de precipitação empregado) ou na redução de sua atividade (EVANS et al., 2009).

Embora prejudiciais às funções da proteína, esses métodos de precipitação são normalmente utilizados para eliminar, de fluidos biológicos, compostos que podem interferir nos processos de purificação e análise.

Os precipitados são característicos devido à sua morfologia, composta por partículas pequenas, sem definição estrutural e desorganizadas no meio. Proteínas precipitadas são agregados suficientemente grandes para serem visíveis e centrifugados (SCOPES, 1988; EVANS et al., 2009).

3.4.2 Cristalização

Os cristais se diferem dos precipitados por serem altamente ordenados e com tamanho de partículas maior (EVANS et al., 2009).

Cristais de proteínas podem ser usados como medicamentos, detergentes e cosméticos, além das mais diversas utilidades das enzimas, sendo a cristalização de proteínas em larga escala vista como uma nova operação unitária industrial na recuperação e purificação de algumas proteínas (MEDEIROS, 2009).

A cristalização de proteínas pode ser utilizada para a purificação de macromoléculas, pois tem capacidade de separá-la da solução, excluindo as impurezas (ZYDNEY, 2016).

Contudo, a maior dificuldade em cristalizar proteínas é a sensibilidade geral e a instabilidade às condições de cristalização a que são submetidas, em particular temperatura e pH. Proteínas são estáveis apenas em uma curta faixa de condições de cristalização e, por este motivo, é preciso conhecer esta faixa para um *downstream* adequado. No caso da utilização da cristalização de enzimas, há mais benefícios, ou seja, além de purificar e isolar a proteína, o processo mantém a atividade enzimática (RYU et al., 2010).

A cristalização é a precipitação controlada de uma solução proteica aquosa. As principais variáveis que controlam a morfologia do cristal e a sua reidratação são a concentração da proteína, a concentração de precipitado, o pH e a temperatura. Assim, é mais difícil cristalizar do que precipitar uma molécula (EVANS et al., 2009).

A cristalização de biomoléculas passa por três etapas fundamentais: nucleação, crescimento e cessação de crescimento. A etapa de nucleação ocorre quando há formação dos primeiros agregados ordenados. As condições utilizadas nesta fase são de difícil repetibilidade, por isso pode-se empregar materiais pré-formados, ou seja, as “sementes de cristalização”. Em seguida, vem a fase de crescimento, na qual moléculas de proteína são adicionadas à superfície do núcleo. E, por último, ocorre a cessação do crescimento, que pode chegar ao fim por diversas causas para macromoléculas. Entre elas estão

defeitos de crescimento ou envelhecimento da macromolécula (EVANS et al., 2009; MEDEIROS, 2013).

3.5 Segundo coeficiente virial (B_{22})

Falar da definição de solução ideal e seus desvios da idealidade de forma análoga aos gases ideais é possível depois das relações estabelecidas por McMillan e Mayer (1945). Isso se deve ao fato de considerar os solventes como um meio contínuo, apesar de suas complexidades, e interagir com as partículas de soluto. Estes pesquisadores formalizaram a analogia entre o comportamento do soluto no solvente e as moléculas interagindo no vácuo (CURTIS; LUE, 2006).

Esta analogia, no entanto, se limitava a solventes e solutos de moléculas orgânicas, até que Zimm (1946) estendeu as equações de potencial termodinâmico para soluções com biomoléculas, geralmente muito maiores. Desde então é possível aplicar as equações de estado a soluções proteicas.

Muitas equações de estado já foram publicadas. No entanto, a maioria delas tem fundamentação total ou parcialmente empírica e equações com esta base sempre envolvem parâmetros arbitrariamente assumidos, o que as tornam válidas apenas para as situações específicas propostas na sua elaboração. Dessa forma, para poder usar uma equação de estado para prever o comportamento dos gases e líquidos nas mais diversas situações é necessário que ela tenha significância física, ou seja, onde os parâmetros podem ser diretamente relacionados às forças intermoleculares envolvidas (NEAL et al., 1998).

Para suprir esta necessidade, surgiu a Equação virial, derivada da termodinâmica estatística, obtida a partir da expansão de Z^1 como uma série de potências de $(1/v)$, mostrada na Equação 3.6. Seus coeficientes podem ser teoricamente relacionados com o potencial das interações intermoleculares, sendo esta sua grande vantagem sobre as demais equações (PRAUZNITZ et al., 1999).

$$Z = \frac{Pv}{RT} = 1 + \frac{B}{v} + \frac{C}{v^2} + \frac{D}{v^3} + \dots \quad 3.6$$

¹Lembrando que para gases e líquidos, o comportamento ideal é o estado onde não há interações moleculares, sendo $Z=1$. E quanto mais distante de 1 o valor de Z está, mais distante do comportamento ideal e mais próximo do comportamento real está o fluido (PRAUZNITZ et al., 1999).

Em que Z é o fator de compressibilidade, P é a pressão no sistema, v é o volume molar, R é a constante dos gases ideais e T é a temperatura do sistema, B é o segundo coeficiente virial, C é o terceiro coeficiente virial, D é o quarto coeficiente virial, e assim sucessivamente. Estes coeficientes refletem as interações moleculares entre duas, três e quatro moléculas, respectivamente (desvio do comportamento ideal) (PRAUZNITZ et al., 1999; VIDAL, 2003).

Há outras formas de escrever a equação virial, como em termos de expansão em série de potências para a pressão.

Em sistemas a baixa pressão é usual que a equação virial seja utilizada truncada no segundo coeficiente virial, pois, estatisticamente, nesta condição as interações de moléculas duas a duas são significativas, enquanto as demais podem ser negligenciadas (SMITH et al., 2001).

Em sua pesquisa fundamental, Zimm (1946) constatou que o segundo coeficiente virial (também chamado de segundo coeficiente virial osmótico, representado por B_{22}) é suficiente para descrever os desvios da idealidade de soluções diluídas de macromoléculas, como proteínas (MEDEIROS, 2013).

Outros parâmetros que podem ser avaliados pelo segundo coeficiente virial em sistemas proteicos são o crescimento de cristais e a interferência do pH, força iônica, natureza e concentração de sais, além da temperatura na cristalização (BAJAJ et al. 2004; BONNETÉ et al. 1999; CHATTORAJ e CHATTERJEE 1976; DESZCZYNSKI et al. 2006; GUO et al. 1999; TESSIER e LENHOFF 2003)

Existem vários métodos para a obtenção experimental do segundo coeficiente virial, conforme apresentado na TABELA 3.2.

TABELA 3.2. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL COM ALGUMAS DE SUAS VANTAGENS E DESVANTAGENS.

Método de obtenção de B_{22}	Princípio de obtenção do B_{22}	Vantagens	Desvantagens
Osmometria de membranas ^{a, b, f, g}	Pressão osmótica	Mede a interação entre soluto-soluto/proteína-proteína em solução	Limitações quanto à solubilidade; Possível interação com a membrana; análise demorada; Grande quantidade de amostra
Espalhamento de luz (SLS) ^{a, c, d}	Intensidade de luz espalhada em função da concentração	Versátil no estudo de soluções proteicas; avalia tamanho e crescimento de cristais	Análise demorada; Grande quantidade de amostra
Cromatografia de auto interação (SIC) ^{a, c}	Tempo de retenção reflete a média de interações	Pouca quantidade de amostra; rápida	A proteína precisa ser imobilizada; Limitações de temperatura
Espalhamento de nêutrons em baixos ângulos (SANS)/ Espalhamento de raio-X em baixos ângulos (SAXS) ^{e, h}	Equivalência entre os fatores estrutural e espacial na origem e a compressibilidade osmótica.	Determinação da estrutura de proteínas;	Análise demorada; Grande quantidade de amostra; Baixa resolução da difração
Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) ^f	Entalpia de diluição	Perfil termodinâmico completo; pouca quantidade de amostra; rápida	É preciso haver componente entálpico para obtenção do perfil energético da interação

^a Medeiros (2013); ^b Lord (1999); ^c Tessier et al. (2008); ^d Velez et al. (1998); ^e Zhang et al. (2012); ^f McBride & Rodgers (2013); ^g Price (2005); ^h Ma et al. (2015).

FONTE: O autor.

Para obter B_{22} empregando a osmometria, truncada no terceiro termo, é utilizada a Equação 3.7.

$$\frac{\Pi}{(RT)} = C + B_{22}C^2 + B_{33}C^3 \quad 3.7$$

Onde Π é a pressão osmótica, R é a constante de gases ideais, T é a temperatura absoluta, C corresponde à razão entre a concentração mássica de soluto e a massa molar dele. B_{22} e B_{33} são o segundo e terceiro coeficiente viriais osmóticos (WILLS; WINZOR, 2009).

Para a técnica de SLS e DLS a equação de obtenção do B_{22} truncada no segundo termo é correspondente à Equação 3.8.

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2B_{22}c \quad 3.8$$

Para a qual K é a constante ótica ou instrumental, R_θ é o limite de Rayleigh, c é a concentração de proteína e M é a massa molar da proteína (BAJAJ et al., 2004; MA et al., 2015).

Quando se trata de proteínas a quantidade de amostra utilizada na análise é um fator de suma importância, uma vez que a obtenção dessas biomoléculas purificadas é muito onerosa. Portanto, esta é uma grande vantagem do ITC sobre as técnicas de osmometria de membranas, SLS, DLS, SAXS e SANS.

Quanto à cromatografia de auto interação (SIC), ao imobilizar a proteína, existe a possibilidade de alterar sua estrutura e, conseqüentemente, alterar o perfil das interações moleculares juntamente com o desvio da idealidade que a proteína apresenta sob as condições determinadas, o que compromete a qualidade dos dados.

Para correlacionar as forças intermoleculares com o segundo coeficiente virial é preciso assumir que a energia interna da interação pode ser expressa em função do coeficiente virial e da densidade como na Equação 3.9:

$$\frac{E}{Nk_B T} = \frac{3}{2} - T \sum_{i=1}^{\infty} \frac{1}{i} \frac{dB_{i+1}}{dT} \rho^i \quad 3.9$$

Onde E representa a variação de energia no sistema, N é o número de moléculas na solução, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, ρ é a densidade de moléculas na solução, e B é o coeficiente virial.

O segundo coeficiente calorimétrico obtido, representado por b_2 , pode ser associado ao coeficiente virial osmótico, representado por B_{22} , por meio da Equação 3.10.

$$b_2 = -T \left(\frac{dB_{22}}{dT} \right) \quad 3.10$$

O segundo coeficiente virial osmótico B_{22} pode ser representado pela função de interação potencial $w(r)$ com base na termodinâmica estatística, como mostra a Equação 3.11, por Neal et al. (1998) como a relação quantitativa entre o segundo coeficiente virial e

as interações moleculares.

$$B_{22}(T) = -2\pi \int_0^{\infty} \left[\exp \left(-\frac{w(r)}{K_B T} \right) - 1 \right] r^2 dr \quad 3.11$$

3.6 Correlação entre B_{22} e a cristalização de proteínas

A partir do fato do segundo coeficiente virial ser um parâmetro com significância física, ou seja, pode ser relacionado às interações moleculares que estão ocorrendo na solução, é possível relacioná-lo com a solubilidade do soluto na solução. Esta foi a conclusão que chegaram os pesquisadores George e Wilson (1994), sendo estes os primeiros pesquisadores a realizar esta correlação.

A partir de resultados de experimentos de SLS, George e Wilson (1994) mediram o segundo coeficiente virial osmótico (mol mL/g^2) de diversas proteínas sob condições previamente conhecidas como favoráveis à cristalização ou não. As proteínas passaram por etapas adicionais de purificação para a retirada de oligômeros presentes na solução e demais impurezas. Os resultados dos ensaios de SLS para a BSA foram plotados em função da concentração de proteína (FIGURA 3.4). O segundo coeficiente virial osmótico (B_{22}) foi obtido a partir da inclinação da reta do ajuste de cada conjunto de dados.

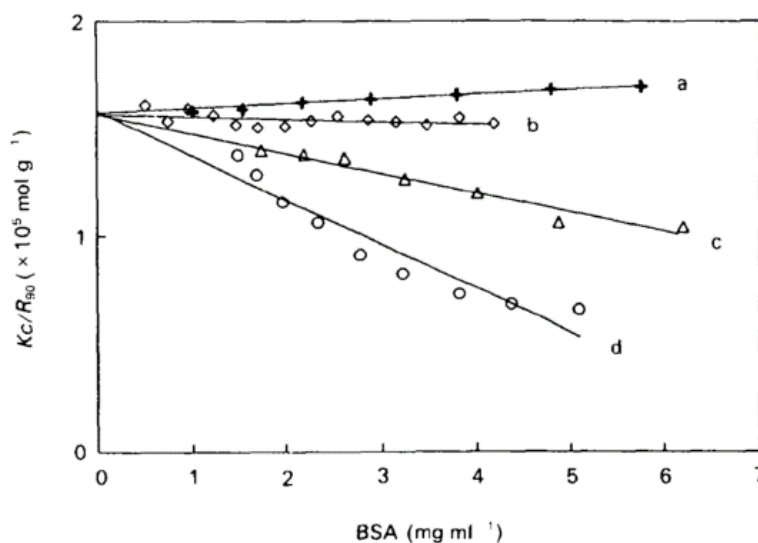


FIGURA 3.4. DADOS DE SLS PARA BSA EM 50 mmol L^{-1} DE TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO, pH 6,5 E 298K COM (a) 20, (b) 37, (c) 52, (d) 60% (v/v) DE SULFATO DE AMÔNIO. FONTE: George e Wilson (1994).

De acordo com a literatura, condições de concentração de sulfato de amônio a partir de 52% são consideradas adequadas à cristalização. Nesta condição o valor de B_{22} foi de $-2,0 \times 10^{-4} \text{ mol mL g}^{-2}$.

Ensaio similares foram realizados para cada par proteína/solvente e os valores de B_{22} para as condições favoráveis à cristalização foram medidos. Compreenderam-se entre -1×10^{-4} e $-8 \times 10^{-4} \text{ mol mL g}^{-2}$, intervalo que os autores sugeriram ser a “janela de cristalização”. Hipoteticamente, caso o B_{22} seja maior que o limite superior, poderá não acontecer a formação de cristais. No entanto, se o B_{22} for menor que o limite inferior, é

provável que não haja formação de estrutura cristalina, mas de um precipitado com estrutura amorfa.

A partir daí surgiram vários modelos teóricos e empíricos para descrever esta relação, como a relação experimental de Guo et al. (1999), as relações teóricas de Haas et al. (1999), Ruppert et al. (2001) e Franco e Pessoa Filho (2012).

3.7 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica é uma técnica que surgiu na segunda metade dos anos 60 com a finalidade de estudar reações químicas. Nos anos 70 a sensibilidade dos instrumentos era na escala de mJ e, com isso, outras aplicações passaram a ser possíveis, tais como o estudo da complexação de metais e a adsorção de compostos aromáticos. Entretanto, apenas nos anos 90 esta técnica começou a ser amplamente desenvolvida e explorada. Esse avanço é atribuído, sobretudo, ao aumento da disponibilidade de calorímetros comerciais na comunidade científica (GROLIER; RÍO, DEL, 2012).

Esta tendência pode ser observada na FIGURA 3.5., elaborada a partir da consulta à base de dados Scopus, realizada em março de 2016. O critério da busca foi “*isothermal titration calorimetry*” no campo “*article title, abstract, keyword*”.

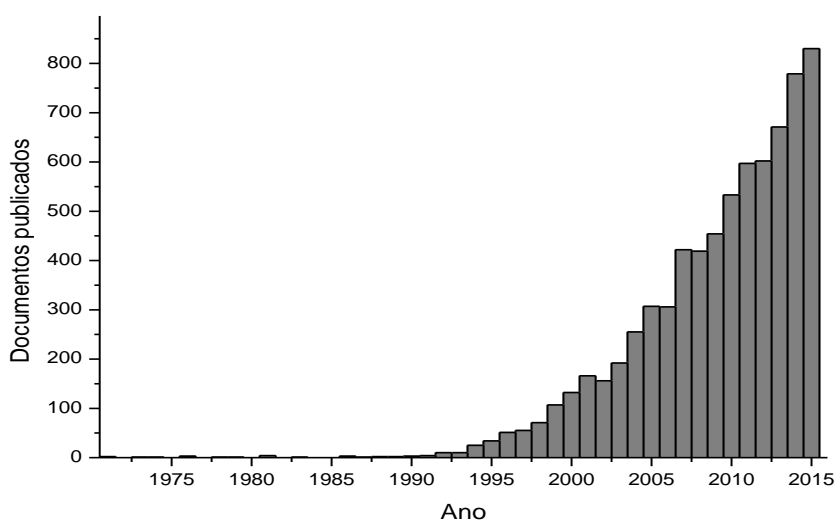


FIGURA 3.5. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS POR ANO RELATANDO CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DE 1971 A 2015.

FONTE: Modificado de SCOPUS (2016).

Os trabalhos que empregam esta técnica são aplicados nas mais variadas áreas. Na indústria de alimentos pode-se citar o trabalho de Kelley (2003), que avaliou a interação da BSA com íons surfactantes, podendo estabelecer uma relação com emulsões alimentares. Na área da saúde Yang et al. (2014) estudou corantes alimentares interagindo com a BSA, proteína comparável às humanas, e Rabbani et al. (2014) que observou a interação de íons de cobre com a β -galactosidase, enzima presente no sistema digestório animal.

Na indústria agro alimentícia, química e farmacêutica é importante salientar que o ITC é um instrumento quantitativo fundamental para a caracterização de interações moleculares, como proteína-proteína, proteína-ligante, drogas-DNA e proteínas-DNA (GROLIER; RÍO, DEL, 2009).

Alguns dos métodos mais comumente utilizados para o estudo das interações intermoleculares encontram-se na TABELA 3.3. Pode-se observar que a grande vantagem do ITC é a geração do perfil termodinâmico completo da amostra estudada, fornecendo dados de entalpia (H), entropia (S), energia de Gibbs (G), constante de associação (K) e estequiometria da reação (N). É a única técnica que determina diretamente as parcelas entálpica e entrópica que contribuem para a ligação (VELAZQUEZ-CAMPOY et al., 2004; DRACZKOWSKI et al., 2014; KABIRI; UNSWORTH, 2014; YANG et al., 2014). O perfil termodinâmico da interação molecular pode fornecer dados importantes para indicar quais forças intermoleculares atuam na ligação.

TABELA 3.3. ALGUMAS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDO DE INTERAÇÕES MOLECULARES.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Ressonância de plasma de superfície (SPR)	Alta sensibilidade, pequeno volume de amostra	Cara, adsorção indesejada de moléculas por componentes instrumentais, fixação da amostra em um suporte
Ultracentrifugação analítica (AUC)	Pequeno volume de amostra, aplicável a estudos com homômeros	Cara, demorada, pode não detectar interações não específicas, fixação da amostra em um suporte
Espectrometria UV-vis	Fácil de usar, barata	Baixa resolução
Ressonância magnética nuclear (NMR)	Alta resolução, informação da natureza estrutural do complexo e mudanças conformacionais	Cara, massa molecular da amostra limitada (40 kDa), requer grande quantidade de amostra
Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	Fácil de usar, alta sensibilidade, aplicável a estudos com homômeros e interações não específicas, dados de perfil termodinâmico	Possibilidade de erro experimental devido à determinação de concentração, é preciso haver componente entálpico para obtenção do perfil energético da interação

FONTE: Adaptado de Kabiri e Unsworth (2014).

A técnica de ITC, apresentada na FIGURA 3.6, consiste em um sistema adiabático no qual há a célula de referência, onde se coloca água, e a célula de medição, onde é inserida a amostra. O calorímetro mantém as células na mesma temperatura. Pequenas alíquotas de ligante são injetadas no sistema e, conforme as injeções acontecem, ocorrem interações que provocam mudança de temperatura. Os termopares captam este evento e medem a diferença de temperatura entre a célula de referência, na qual não está acontecendo evento algum, e a célula de amostra (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012; KABIRI; UNSWORTH, 2014). Então, os compensadores de calor trabalham de forma a reestabelecer o equilíbrio térmico no sistema ($\Delta T=0$) em até 10 segundos. Se foi necessário fornecer calor pode-se concluir que a reação requereu energia, então a temperatura do meio diminuiu (reação endotérmica). Se foi preciso retirar calor, a reação liberou energia e a temperatura do meio aumentou (reação exotérmica) (FELTRE, 1983; KABIRI; UNSWORTH, 2014).

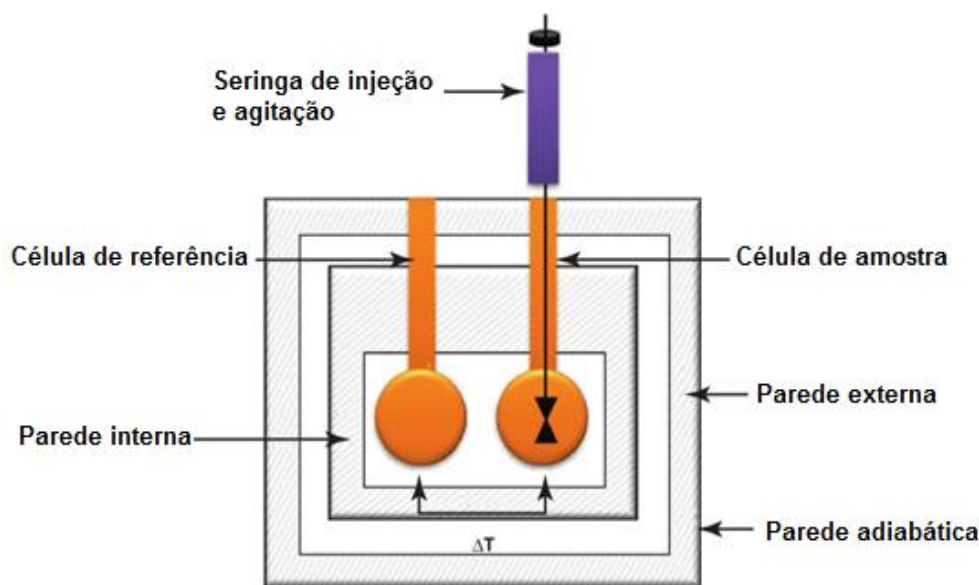


FIGURA 3.6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CALORÍMETRO DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.

FONTE: Adaptado de Bouchemal e Mazzaferro (2012).

A energia fornecida ao sistema é plotada em função do tempo, gerando dados brutos da análise (seção (A) da FIGURA 3.7).

O pico resultante de cada injeção é integrado e plotado em função da razão molar da amostra no momento da titulação que o causou, de forma a produzir a isoterma de ligação (seção (B) da FIGURA 3.7), cujo formato ideal é o da sigmoide. A partir desta curva são medidos diretamente os dados de variação da entalpia – ΔH (corresponde à intersecção das duas linhas assintóticas correspondentes para a formação de calor mínima e máxima), estequiometria da reação – N (controla a posição do ponto de inflexão da sigmoide) e constante de associação – K_a (correspondente à inclinação no ponto de inflexão) (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012; NÚÑEZ et al., 2012).

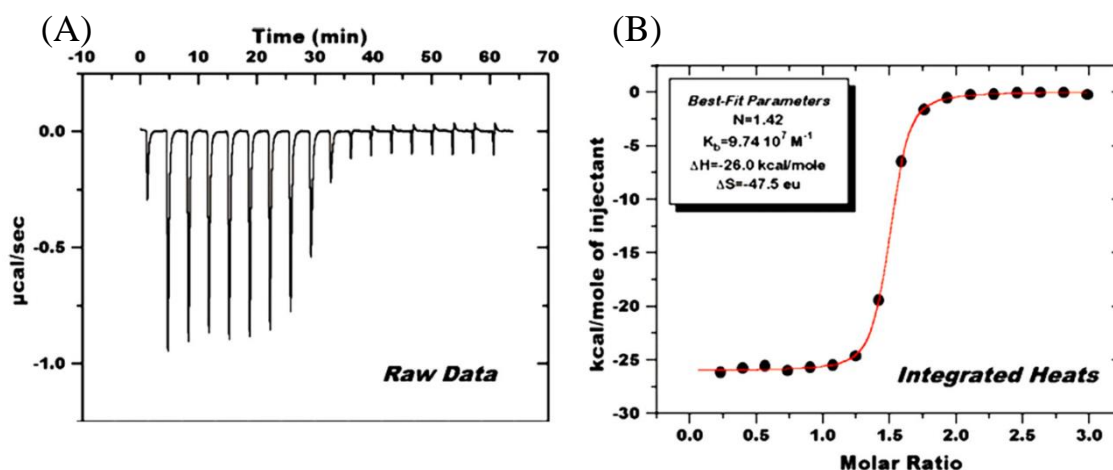


FIGURA 3.7. CURVAS TÍPICAS OBTIDAS DA ANÁLISE DE ITC. a) DADOS BRUTOS: FLUXO DE CALOR EM FUNÇÃO DO TEMPO; b) GRÁFICO OBTIDO APÓS O TRATAMENTO DOS DADOS BRUTOS: INTEGRAL DE CADA PICO EM FUNÇÃO DA RAZÃO MOLAR.

FONTE: Adaptado de Draczkowski et al. (2014).

Contudo, neste estudo, o dado de interesse é o calor de diluição, para o qual a curva formada é diferente da FIGURA 3.7. Para esta situação não ocorre ligação entre a macromolécula e o ligante, o que é refletido pelo ITC conforme ilustra a FIGURA 3.8.

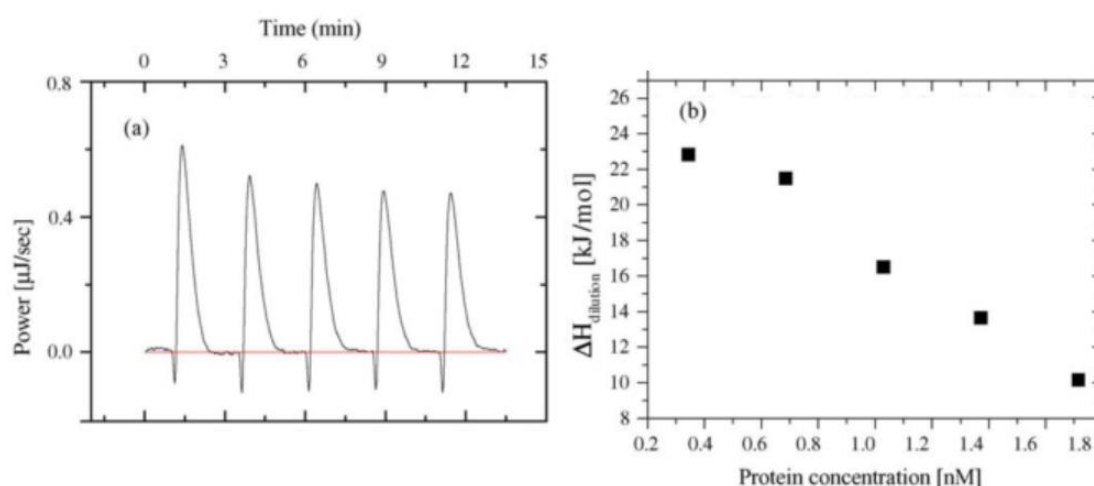


FIGURA 3.8. CURVAS OBTIDAS DA ANÁLISE DE ITC PARA A ENTALPIA DE DILUIÇÃO.

FONTE: Adaptado de Huang et al. (2005).

O calor de diluição, ou calor de mistura, é o dado primário medido em técnicas calorimétricas. Estes dados devem ser documentados, pois são muito importantes para compreensão do comportamento da solução no nível molecular. Este é um dado termodinâmico muito importante tanto para o ponto de vista prático quanto teórico (GROLIER, 2015).

Segundo Pollit et al. (2005), há alguns dados na literatura a respeito do calor de diluição, contudo, não é pertinente fazer comparações entre eles. Os valores encontrados apresentam muita variação. Isso pode acontecer devido às diferenças nos sistemas para obtenção deste dado. Há autores que utilizam calorímetros de mistura, calorímetros de fluxo e calorimetria de titulação. Variáveis como a taxa de diluição, o volume de injeções

e a forma de titulação também são responsáveis por diferenças nas medidas experimentais.

No caso das proteínas, um cuidado especial com o pH, devido à natureza química de suas ligações e suas propriedades, é necessário. A alteração do pH pode causar outras reações, como a desnaturação e alterações de solubilidade, que produzirão calor (FENNEMA et al., 2010), causando erro na análise. Por esse motivo, é necessário realizar a análise em uma solução tampão.

3.8 Uso da calorimetria para determinação do segundo coeficiente virial de proteínas

Poznanski et al. (2004) publicaram o primeiro estudo correlacionando o uso do ITC ao segundo coeficiente virial. Estudaram também a relação do B_{22} e da interferência dos sais neste meio. A proteína utilizada foi a lisozima de clara de ovo. Foram realizados 16 experimentos com concentrações de NaCl idênticas e variando a concentração da lisozima de 0,5 a 8,95 mmol L⁻¹, com 12 injeções em cada experimento. Para minimizar os erros de diluição não referentes à proteína, foi titulada a solução de NaCl sobre o tampão, e estes valores foram descontados do experimento. Em todos os testes a entalpia de diluição diminuía da primeira para a última injeção, aumentando de acordo com o acréscimo da concentração de proteínas. Este estudo, a partir dos dados de segundo coeficiente virial obtidos, sugere que o NaCl induz à agregação.

No ano seguinte, Poznanski et al. publicaram um estudo muito semelhante. Foram realizados 14 experimentos variando a concentração da solução salina de NaCl de 0,0 a 0,9 M, com 20 injeções cada um. A concentração de proteína utilizada foi de 7,0 mmol L⁻¹. O comportamento observado quanto à entalpia de diluição foi análogo ao do estudo de 2004, ou seja, houve redução do calor de acordo com o número de diluições e houve aumento do calor de acordo com o acréscimo na concentração de sal. Da mesma forma, foi feito o tratamento estatístico dos dados. A concentração ótima de sal para a cristalização determinada foi de 0,6 M. Os autores concluíram que o uso da microcalorimetria é adequado como método independente para determinação da concentração ótima de sal para a cristalização de proteínas (POZNAŃSKI et al., 2005).

Baseado na termodinâmica estatística, nas considerações de McMillan e Mayer (1945) e na hipótese da esfera dura, Chen et al. (2000) desenvolveram um modelo para determinar o segundo coeficiente virial calorimétrico em microemulsões. Neste modelo a relação entre o calor de diluição (Q_{Dil}) e o segundo coeficiente virial calorimétrico (b_2) considera o calor de diluição das proteínas análogo à energia interna do sistema (E) e que

em sistemas líquidos abertos a diferença de pressão é nula e o volume de diluição é negligenciável comparado ao volume total da solução no sistema. Esta relação é apresentada na Equação 3.12, onde N é o número de partículas (número de gotas de micelas reversas na solução), k_B é a constante de Boltzmann (J/K), T é a temperatura absoluta (K), Φ_w é a fração de água em volume na solução, e b_2 , b_3 e b_4 são os coeficientes viriais ajustados à função polinomial de segunda ordem.

$$\frac{d(Q_{Dil}/Nk_B T)}{d\Phi_w} \cong \frac{d(E/Nk_B T)}{d\Phi_w} = b_2 + b_3\Phi_w + b_4\Phi_w^2 \quad 3.12$$

Este mesmo modelo foi utilizado posteriormente por diversos autores (LIU et al., 2000; HUANG et al., 2003; CHERN et al., 2006; LIN et al., 2007; LI et al., 2008; ZHENG et al., 2011) para sistemas da mesma natureza e com algumas adaptações para estudo de lipossomos.

Huang et al. (2005) foram os primeiros a utilizar o modelo de Chen et al. (2000) para sistemas proteicos. Eles utilizaram a proteína IFN- α 2a humana recombinante (hrIFN- α 2a) diluída em solução tampão fosfato de potássio 20 mmol L⁻¹. Os ensaios de titulação isotérmica foram realizados num equipamento da MicroCal Inc., contudo os autores não informaram maiores detalhes sobre o tipo do calorímetro. Os parâmetros avaliados neste estudo foram a interferência de tratamento térmico na amostra (aquecimento de 30 a 50°C, resfriamento a 40°C e a 50°C), efeito de sais (0,1 mol L⁻¹ NaCl, 0,5 mol L⁻¹ NaCl e 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃), pH (6,0 e 8,0), presença e concentração do surfactante Polissorbato 20 (0,01% e 0,02%) e estresse mecânico (centrifugação e vortex). Os tratamentos térmicos e estresse mecânicos desempenhados nas amostras foram realizados antes do ensaio de titulação isotérmica. Sendo obtidos 5 ensaios para cada condição, mas 2 destes foram descartados ao obter o segundo coeficiente calorimétrico. Foi realizado ensaio de SEC para confirmar dados de agregação. Observou-se que a armazenagem do hrINF- α 2a em solução a baixas temperaturas e afastada do ponto isoelétrico da proteína, em conjunto com uma limitação de tensão mecânica na presença de um agente tensoativo pode reduzir as interações atrativas proteína-proteína, minimizando a agregação. Foi observado que, apesar de aumentar a agregação das proteínas, a ação de sais pode estabilizar a conformação estrutural das proteínas. A partir destas considerações, os autores asseguraram que a formulação de um meio capaz de estabilizar fisicamente a proteína deve ser feita considerando as interações intra e intermoleculares. A conclusão deste trabalho foi que para estudar a otimização da estabilidade da proteína é necessário ter uma abordagem sistemática, e que o uso do ITC para obter os resultados de segundo coeficiente virial calorimétrico é possível.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreve a preparação de amostras, as análises realizadas e o tratamento de dados que foram adotados. Os procedimentos foram baseados em testes preliminares e trabalhos científicos que obtiveram o segundo coeficiente virial osmótico (B_{22}) para as proteínas estudadas.

4.1 Preparação das soluções

A albumina de soro bovina ($\geq 98\%$) foi obtida da Sigma-Aldrich® (Estados Unidos). A lisozima de clara de ovos de galinha ($\geq 98\%$) foi obtida da Himedia® (Índia). As amostras foram armazenadas de acordo com as instruções do fabricante. Para o preparo das soluções foi utilizada água osmolisada (equipamento Smart VOS 106, Voxer, Brasil).

As soluções proteicas foram preparadas a partir de soluções tampão com pH e molaridade desejados. Visando reduzir a interferência dos sais nas análises de ITC, foi feita a diálise dessas soluções em membrana com limite de exclusão de 12kDa, fabricada pela Sigma-Aldrich® (Estados Unidos), contra solução tampão, a cerca de 5°C, durante 12 horas.

Para a BSA, as soluções proteicas com concentração próxima a 0,6 mmol L⁻¹, foram preparadas em soluções tampão (ácido cítrico-fosfato dibásico 80 mmol L⁻¹) para os pHs 4,6, 5,4 e 7,4. As soluções proteicas foram submetida às seguintes condições: ausência de sal, 0,05 mol L⁻¹, 0,10 mol L⁻¹, 0,15 mol L⁻¹ e 0,50 mol L⁻¹ de cloreto de sódio. Além disso, foram realizados ensaios da BSA com 0,15 mol L⁻¹ de sulfato de amônio para os três valores de pH trabalhados.

A solução de lisozima teve concentração aproximada a 2,1 mmol L⁻¹, e foi preparada em soluções tampão para os pH 4,6 (tampão acetato 80 mmol L⁻¹) e 7,0 (tampão Tris-HCl 80 mmol L⁻¹). As condições às quais a solução proteica foi submetida são: ausência de sal, 0,10 mol L⁻¹, 0,20 mol L⁻¹ e 0,50 mol L⁻¹ de NaCl.

A escolha dos pHs analisados, das concentrações salinas e dos tampões foi baseada nas condições em que constam dados de segundo coeficiente virial na literatura.

O pH das soluções foi medido no pHmetro Orion 2 Star pH Benchtop (Thermo Scientific, Estados Unidos) e, quando necessário, foram usadas alíquotas de NaOH ou HCl 1 mol L⁻¹ para ajuste.

4.2 Determinação da concentração das soluções proteicas

Para quantificar a concentração de proteína nas soluções foi utilizado o método espectrofotométrico.

Alíquotas de 2 µL das soluções proteicas foram analisadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) sob comprimento de onda de 280nm.

O coeficiente de extinção para ambas as proteínas foi obtido pelo *software* ProtParam, que requer a sequência de aminoácidos da proteína para este cálculo. Este dado foi obtido no sítio do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), tomando como base de pesquisa o número de resíduos de aminoácido para cada proteína, informado pelo fabricante, e a massa molar (583 resíduos e 66,4 kDa para a BSA e 129 resíduos e 14,6 kDa para a lisozima).

Os valores de coeficiente de extinção utilizados foram $\epsilon_{BSA}/1000 = 42,925$ e $\epsilon_{Lisozima}/1000 = 37,970$.

4.3 Obtenção da entalpia de diluição por ITC

Em um calorímetro modelo ITC₂₀₀, da MicroCal (Northampton, Estados Unidos), foram realizadas oito injeções, sendo a primeira com um volume menor (1,90µL), prática comum às análises desta natureza para estabilizar o sistema, seguida de sete injeções com volume igual (4,75µL). O atraso inicial foi de 60 segundos e, após a primeira injeção, o intervalo entre elas foi de 300 segundos. A temperatura do sistema foi fixada em 25°C e a rotação em 300 rpm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para realizar experimentos neste tipo de equipamento é preciso verificar as condições e os fatores que podem produzir alterações no meio. Quando se deseja estudar as interações em um sistema binário (componentes 2 e 3) em um solvente (1), inicialmente deve-se avaliar diversas influências por meio de quatro experimentos. No primeiro, o componente 2 dissolvido em 1 deve ser titulado sobre o componente 3 no mesmo solvente. No segundo experimento deve ser feita a titulação do solvente 1 sobre o componente 3. E, por último num terceiro experimento deve ser feita a titulação do componente 2 dissolvido em 1 sobre o solvente 1 puro. Por fim, deve ser feita a titulação do solvente 1 sobre ele mesmo. Assim, o balanço das interações se dá pela Equação 4.1 (GROLIER; RÍO, DEL, 2009).

Calor de interação

$$= [\text{Calor do experimento 1}] - [\text{Calor do experimento 2}] - [\text{Calor do experimento 3}] + [\text{Calor do experimento 4}] \quad 4.1$$

Do ponto de vista prático, os experimentos 3 e 4 são negligenciáveis, de modo que sejam necessários apenas os experimentos 1 (proteína diluída em solução tampão sobre a solução salina) e 2 (solução tampão sobre a solução salina). Portanto, para a obtenção de dados mais precisos foi feito o procedimento de acordo com a Equação 4.2.

Calor de interação

$$= [\text{Calor do experimento 1}] - [\text{Calor do experimento 2}] \quad 4.2$$

Os dados obtidos na análise de ITC foram tratados no *software* Origin® 7.0. Foi feita a subtração dos dados de referência dos dados tratados, e foi removido o primeiro ponto de todas as curvas de dados tratados.

4.4 Obtenção do calor de diluição

Para compreender a calorimetria de titulação isotérmica é preciso comentar princípios termodinâmicos fundamentais sobre os quais esta técnica está alicerçada. Estas observações foram realizadas por Grolier e Río (2009) e Grolier (2015), com contribuições de Chen et al. (2000), Liu et al. (2000) e Huang et al. (2005).

Assume-se que o sistema trabalhado consiste num processo de mistura e ocorre sob condições isobáricas e isotérmicas. Tal mistura é acompanhada por uma variação de volume, ΔV . Esta mudança pode ser expressa sob forma de trabalho de expansão (ΔW), definido na Equação 4.3.

$$\Delta W = -p\Delta V \quad 4.3$$

Para manter o sistema isotérmico é preciso trocar calor Q com as vizinhanças para compensar a variação de energia interna (ΔU) e o trabalho de expansão. De acordo com a Primeira Lei da Termodinâmica, quando um processo com incremento ocorre em um sistema fechado, a variação diferencial de energia interna é a soma algébrica da variação do calor e do trabalho trocados durante o processo (Equação 4.4).

$$dU = dQ + dW \quad 4.4$$

Quando δQ é maior que zero, a energia foi transferida da vizinhança para o meio (através de aquecimento elétrico). Uma vez que houve acréscimo no calor do sistema, o evento foi endotérmico. Se δQ é menor que zero, houve transferência de calor para a vizinhança do sistema, indicando um evento exotérmico.

Por definição, sabe-se que a propriedade extensiva chamada de entalpia (H) é dada pela Equação 4.5 (SONNTAG et al., 2009).

$$H \equiv U + PV \quad 4.5$$

Sabendo que o sistema em questão é considerado isobárico ($\Delta P=0$), é possível sugerir que a variação da entalpia pode ser expressa pela Equação 4.6.

$$dH = dU + PdV \quad 4.6$$

A partir da Equação 4.6, observa-se que nela está contido o conceito do trabalho de expansão do processo (Equação 4.3). Assim, surge a relação expressa pela Equação 4.7.

$$dU = dH + dW \quad 4.7$$

Ao comparar as Equações 4.7 e a 4.4, conclui-se que para processos isobáricos a variação do calor de mistura (dQ) é igual à variação de entalpia da mistura (dH) e, consequentemente:

$$\Delta H = \Delta Q \quad 4.8$$

Esta relação é obtida para o sistema a partir das considerações teóricas obtidas a partir do princípio de funcionamento do ITC, a primeira lei da termodinâmica, e sugere que o sinal obtido no calorímetro (entalpia de diluição) é correspondente direto do calor de diluição. Contudo, neste contexto, surgem algumas considerações a serem feitas.

De acordo com a Equação 4.8, quando se titula água pura sobre água pura o resultado esperado é nulo. No entanto, isto não é observado (FIGURA 4.1).

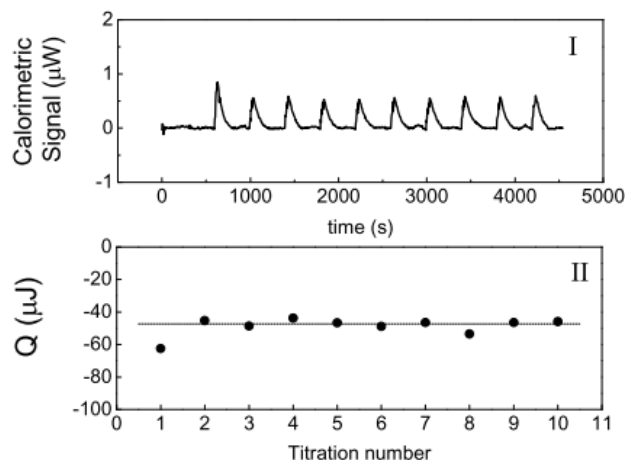


FIGURA 4.1. DILUIÇÃO DE UMA AMOSTRA DE ÁGUA PURA SOBRE ELA MESMA POR ITC.
Fonte: Grolier e del Río (2012).

Efetivamente, do ponto de vista termodinâmico, o processo de titulação pode ser descrito como um sistema isobárico e isotérmico. Reaplicando a 1ª Lei da Termodinâmica, por balanço de energia, tem-se a Equação 4.13:

$$\Delta U = \Delta Q + \Delta W \quad 4.9$$

Em que ΔU é a variação da energia interna do sistema dentro da célula de volume V_{Cell} , ΔQ é o calor medido no calorímetro e ΔW é o trabalho associado. Além disso, é válida a consideração de que o sistema é isovolumétrico devido à forma de construção e operação do calorímetro utilizado neste estudo (o iTC₂₀₀ é um calorímetro de célula cheia). E em processos com volume constante são verdadeiras as seguintes igualdades:

$$\Delta U = \Delta H \quad 4.10$$

$$\Delta H = \Delta Q + \Delta W \quad 4.11$$

Avaliando as Equações 4.8 e 4.11 é possível inferir que existe um fator que provoca a mudança de energia no sistema que, até então, era desconsiderado: o trabalho necessário para efetuar a injeção.

A Equação 4.11 expressa o sinal obtido quando um líquido é titulado sobre ele mesmo. Neste processo, $\Delta H = 0$, então $\Delta Q = -\Delta W$. Ou seja, a quantidade de calor medida no ensaio é proveniente do trabalho de deslocamento realizado pelo êmbolo da seringa para introduzir na célula uma quantidade de líquido que, através da drenagem capilar, será forçado a sair da célula. É preciso aplicar trabalho para substituir uma

quantidade de líquido na célula. Este é o trabalho de injeção ΔW_{inj} e seu correspondente em calor é o calor de injeção ΔQ_{inj} , medido no calorímetro. Assim, a variação de entalpia medida na célula pelo protocolo de injeção é dada pela Equação 4.12, com variação na Equação 4.13.

$$\Delta H = \Delta Q + \Delta W_{inj} \quad 4.12$$

$$\Delta Q = \Delta H - \Delta W_{inj} \quad 4.13$$

Retornando ao conceito do protocolo de experimentos citado no item 4.3 e aplicando esta nova definição à Equação 4.2 e ao sistema estudado, tem-se as Equações 4.14 e 4.15.

$$\Delta Q_{Dil} = (\Delta Q_1 + \Delta W_{inj}) - (\Delta Q_2 + \Delta W_{inj}) \quad 4.14$$

$$\Delta H_{Dil} = (\Delta H_1 - \Delta W_{inj}) - (\Delta H_2 - \Delta W_{inj}) \quad 4.15$$

Onde ΔQ_{Dil} é o calor de diluição da proteína na solução salina, ΔQ_1 é o calor medido no experimento 1 (proteína diluída na solução tampão sobre solução de sal no mesmo tampão), ΔQ_2 é o calor medido no experimento 2 (solução tampão pura diluída sobre solução de sal no mesmo tampão) e ΔW_{inj} é o trabalho de injeção.

Como os experimentos 1 e 2 foram realizados utilizando a mesma metodologia, descrita no item 4.3, é correto afirmar que o trabalho de injeção ΔW_{inj} é igual para ambos os ensaios. Desta forma, tem-se que o calor de diluição da proteína ΔQ_{Dil} sobre a solução salina (já descontando as demais interferências do sistema) é dado pela Equação 4.16. De maneira análoga, tem-se a entalpia de diluição ΔH_{Dil} na Equação 4.17.

$$\Delta Q_{Dil} = \Delta Q_1 - \Delta Q_2 \quad 4.16$$

$$\Delta H_{Dil} = \Delta H_1 - \Delta H_2 \quad 4.17$$

Os dados tratados do ensaio, fornecidos pelo *software* Origin[®], são entalpia de diluição molar ou calor de diluição molar (em J/mol). Para aplicar esta informação à equação de determinação do segundo coeficiente virial calorimétrico é necessário multiplicá-la pela quantidade de mols (n , em mol) de proteína no momento da injeção a fim de obter o calor de diluição na unidade apropriada a esta aplicação (J).

$$\Delta Q_{Dil}(J) = n(mol) \times \Delta Q_{Dil}(J \text{ mol}^{-1}) \quad 4.18$$

4.5 Correlação do calor de diluição com o segundo coeficiente virial

Ao adaptar a relação de Chen et al. (2000) para sistemas proteicos e truncá-la no segundo coeficiente virial calorimétrico, conforme é apresentado no item 3.8, Huang et al. (2005) obtiveram a relação mostrada na Equação 4.19.

$$\frac{d(Q_{\text{diluição}}/Nk_B T)}{d\rho} \cong \frac{d(E/Nk_B T)}{d\rho} = b_2 \quad 4.19$$

Na qual ρ é o número de densidade do soluto, que pode ser obtido pela razão entre o número de moléculas de proteína (N) e o volume da solução (V), conforme mostrado na Equação 4.20.

$$\rho = \frac{N}{V} \quad 4.20$$

O que permite que conceitos desenvolvidos para coloides possam ser adaptados para proteínas é o fato do tamanho da macromolécula de uma proteína globular (3 – 10 nm) ser tipicamente o tamanho da nanopartícula coloidal (YAMPOLSKAYA; PLATIKANOV, 2007).

De acordo com os procedimentos realizados por Chern et al. (2006), o coeficiente virial (b_2) é obtido a partir da representação gráfica de $D_{\text{diluição}}/Nk_B T$ versus ρ . O valor de b_2 é dado pela inclinação do ajuste linear dos dados. Esse parâmetro descreve qualitativamente as interações moleculares no meio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção apresentam-se as curvas obtidas nos ensaios de ITC, bem como os resultados obtidos a partir do tratamento dos dados de calor de diluição para obtenção do segundo coeficiente virial calorimétrico (b_2). Todos os gráficos aqui referidos podem ser encontrados nos Apêndices. A partir do calor de diluição e do segundo coeficiente virial calorimétrico medidos foi elaborada uma relação com as possíveis interações moleculares da solução e estabelecida a relação qualitativa com o segundo coeficiente virial osmótico (B_{22}) e a solubilidade.

5.1 Avaliação do calor de diluição obtido por ITC

As análises de ITC foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3 e visaram a obtenção de curvas de diluição para as soluções de BSA e lisozima sob condições variadas de pH e concentração de cloreto de sódio e sulfato de amônio, trabalhando sempre com temperatura constante (25°C).

A concentração de proteínas utilizada foi escolhida a partir de testes preliminares, nos quais se determinou que, para este estudo, a concentração mais adequada de BSA é 35mg/mL (0,5 mmol L⁻¹) e 30mg/mL (2,1 mmol L⁻¹) para a lisozima. Esta adequação está relacionada à menor quantidade de proteína relacionada à maior intensidade de sinal.

A concentração máxima de sal utilizada neste estudo (0,50 mol L⁻¹ NaCl) também foi determinada por testes preliminares, já que com concentrações acima desta, o limite de detecção do equipamento utilizado era extrapolado.

Na FIGURA 5.1. é ilustrada uma curva exotérmica típica da diluição realizada neste estudo. Este tipo de curva é gerada a partir de ensaios nos quais há liberação de energia com o decorrer das injeções. Todas as curvas de diluição obtidas neste trabalho são apresentadas no APÊNDICE 1.

No tratamento dos dados, descrito no item 4.3, é mencionada a etapa de subtração dos dados de referência, também chamados de “brancos”². Estas curvas são o resultado da diluição da solução tampão pura sobre a solução salina. Devido à intensidade

² As curvas de referência obtidas se encontram no APÊNDICE 2.

e à característica da curva de referência, ao subtraí-la da curva de amostra o padrão desta pode ser invertida.

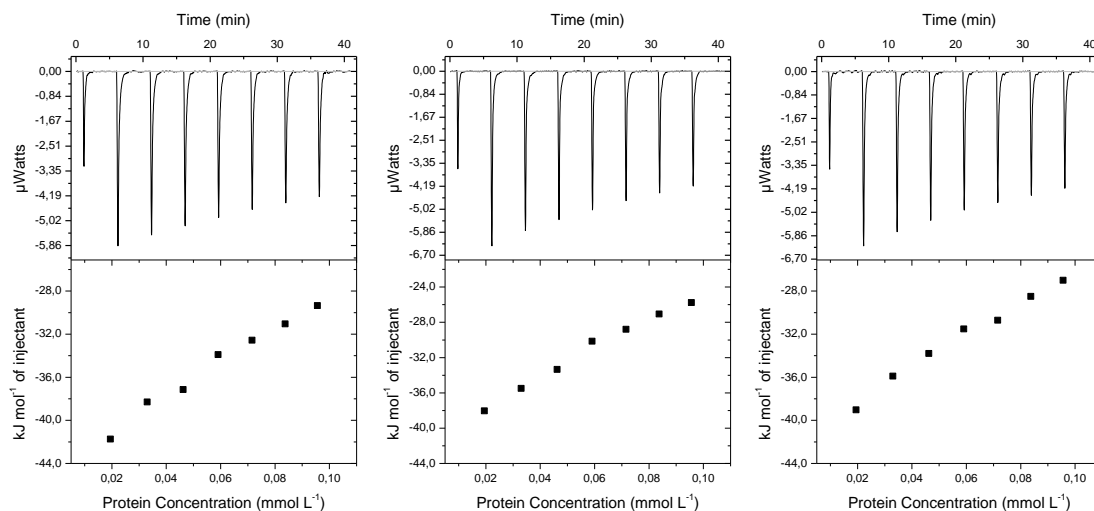


FIGURA 5.1. CURVAS DE ITC (TRIPLICATA) PARA A TITULAÇÃO DE SOLUÇÃO PROTEICA DE BSA EM SOLUÇÃO TAMPÃO, COM $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ DE NaCl A pH 5,4.

Esta inversão ocorreu com as curvas de BSA com $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio, para todos os pHs (ilustrado na FIGURA 5.2). Nestes casos, a curva do branco é endotérmica, assim como a curva do ensaio. Ao subtrair o branco da amostra se obtém calor exotérmico, expresso apenas nos dados tratados. Os dados brutos, mesmo após a subtração, não são alterados.

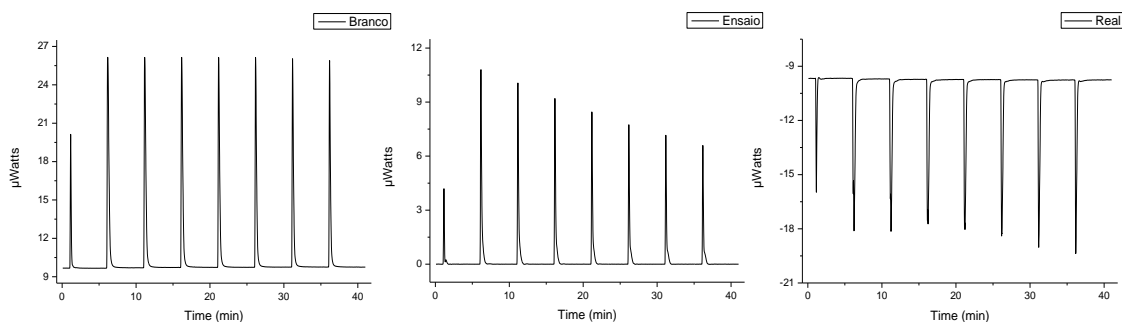


FIGURA 5.2. ILUSTRAÇÃO DA SUBTRAÇÃO DE DADOS DE REFERÊNCIA (ESQUERDA) DOS DADOS DO ENSAIO (CENTRO), RESULTANDO EM DADOS REAIS (DIREITA), CUJOS PICOS GERAM A CURVA DE DADOS TRATADOS.

Para possibilitar uma avaliação mais sistemática dos dados de diluição, obtidos no ITC, foram analisados os valores médios de calor de diluição ΔQ_{Dil} , calculados a partir da média do calor produzido nas sete injeções para cada condição estudada.

Na metodologia utilizada a primeira injeção de proteína foi de menor volume que as demais injeções e foi desconsiderada dos dados brutos. Desta forma, para a segunda e subsequentes injeções, o calor medido foi relacionado à mistura de uma solução concentrada de proteína em outra solução com menor concentração de proteína.

Ao examinar a FIGURA 5.3, para a BSA, e a FIGURA 5.4, para a lisozima, se pode notar que, em geral, para ambas as proteínas, o calor de diluição obtido foi exotérmico. Além disso, é possível perceber claramente que conforme a concentração salina no meio aumenta, o ΔQ_{Dil} aumenta em magnitude, ou seja, é mais exotérmico.

A respeito das características termodinâmicas dos ensaios de diluição (endotérmico ou exotérmico), é necessário fazer algumas observações para avaliá-las.

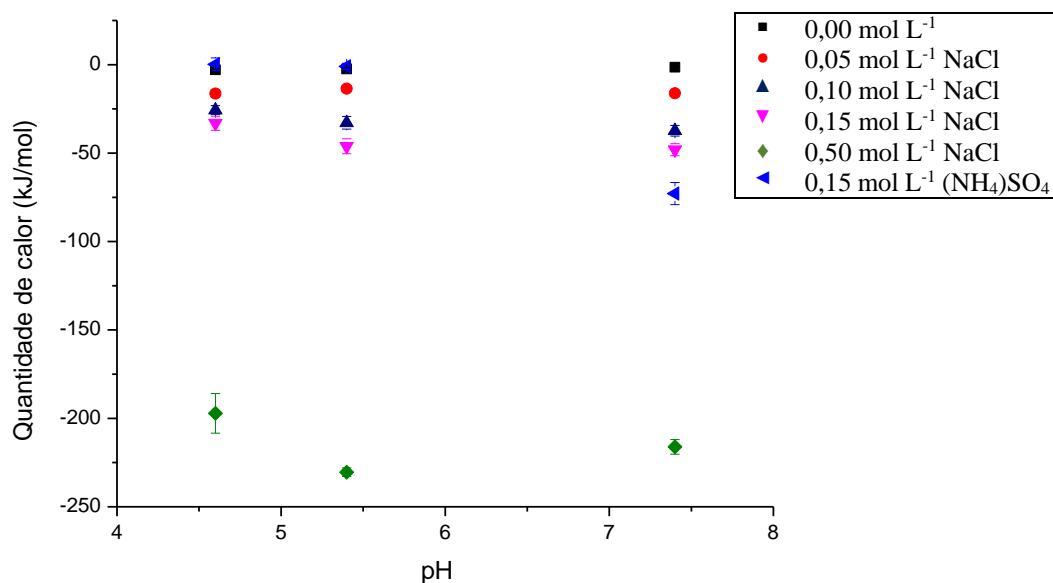


FIGURA 5.3. VARIAÇÃO DE CALOR DE DILUIÇÃO MOLAR OBTIDA PARA BSA NO ITC.

Segundo Zhu e Streng (1996), quando ocorre a diluição de uma solução concentrada, uma certa quantidade de moléculas de solvente interrompe as interações com outras moléculas de solvente (valores positivos de ΔH , que indicam o processo endotérmico) para interagir com a superfície da biomolécula que está sendo diluída (valores negativos de ΔH , que caracterizam processo exotérmico), promovendo a solvatação. Na maior parte dos casos o calor líquido deste processo é exotérmico. Portanto, o calor endotérmico sugere fortemente que algumas interações, como entre íons e biomoléculas, são quebradas na diluição.

De acordo com Semenova e Dickinson (2010), as interações hidrofóbicas são moderadamente fortes e endotérmicas (5 - 40kJ/mol). São interações atrativas de longo alcance entre grupos não polares separados por água, o que para sistemas proteicos significa o aumento das interações proteína-proteína e a redução das interações proteína-água. Estas forças levam à formação de agregados proteicos.

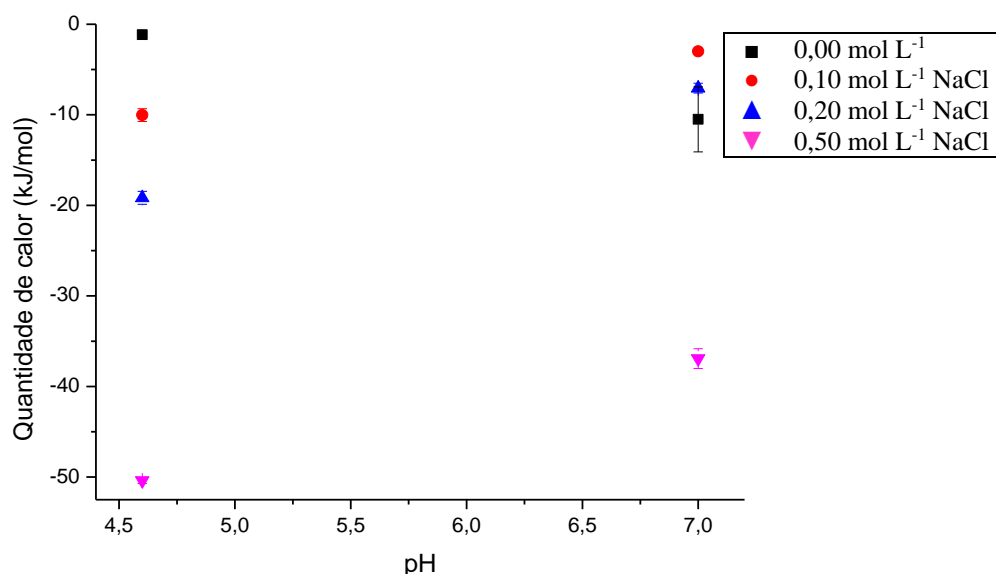


FIGURA 5.4. VARIAÇÃO DE CALOR DE DILUIÇÃO MOLAR OBTIDA PARA LISOZIMA NO ITC.

As interações eletrostáticas podem ser tanto atrativas quanto repulsivas. São relativamente fortes quando comparadas às interações não covalentes e são geralmente exotérmicas.

Assim, é possível elaborar algumas investigações (HUANG et al., 2003). É possível que os eventos exotérmicos, de cada ponto da FIGURA 5.3 e FIGURA 5.4, sejam o resultado do balanço entre o rompimento de moléculas de solvente entre si (ΔH positivo), interação eletrostática das moléculas de solvente (água e íons) com a superfície da proteína (ΔH negativo) interação eletrostática entre as moléculas de solvente (ΔH negativo), e a interação atrativa entre as moléculas de proteína (ΔH positivo).

Todas as curvas de referência com presença de sais são endotérmicas. Nestes meios há apenas água e sais, de forma que as interações hidrofóbicas sejam improváveis. Então, como a solução tampão pura está sendo titulada sobre a solução tampão com sais, é possível que o sinal endotérmico destes ensaios seja causado pela quebra de ligações entre as moléculas do tampão.

As condições utilizadas para a BSA e para a lisozima, associadas ao NaCl, não geraram eventos endotérmicos. Portanto, é possível sugerir que estas condições não favorecem suficientemente as interações hidrofóbicas em relação às outras interações, enquanto há a possibilidade de interações eletrostáticas e de solvatação da proteína no meio. Desta forma, para estas condições não há favorecimento de cristalização ou precipitação das proteínas por interações entálpicamente dirigidas.

Contrapondo os dados entre as duas proteínas estudadas é possível perceber que as curvas para as mesmas concentrações salinas têm intensidade muito menores para a lisozima do que para a BSA. Considerando resultado do balanço da energia, proveniente das possíveis interações no meio, supõe-se que para a lisozima mais interações de caráter atrativo entre molécula de proteína (endotérmicas) e/ou mais interações de hidratação e solvatação (exotérmicas) acontecem do que para BSA. Isso sugere que as moléculas de lisozima realizam mais interações hidrofóbicas do que as moléculas de BSA sob as mesmas condições, ou seja, a lisozima apresentou maior tendência à agregação do que a BSA.

Para o calor das titulações de BSA sobre $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de amônio é possível perceber um evento endotérmico nos valores de pH 4,6 e 5,4. Entretanto, no pH 7,4 o calor de diluição obtido foi exotérmico. Sugere-se que, nas condições endotérmicas, as interações hidrofóbicas sejam significativas em relação às interações eletrostáticas, ou melhor, há maior possibilidade de cristalização da BSA. Para a condição de calor exotérmico é possível que as interações hidrofóbicas sejam menos pronunciadas. Essa diferença de comportamento da solução mostra que o valor do pH tem efeito sobre as interações moleculares.

Ao comparar os eventos que ocorrem com a BSA sob condições de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio e sulfato de amônio, se observa uma diferença no calor de diluição gerado. Como o sulfato de amônio provocou calor endotérmico e o cloreto de sódio provocou calor exotérmico, sugere-se que o sulfato de amônio é mais eficiente em promover as interações entre as moléculas de proteína e, conseqüentemente, a cristalização da BSA do que o cloreto de sódio.

Conforme já foi observado, não é possível comparar a magnitude de dados de calor de diluição obtidos com a literatura, devido aos diversos fatores que interferem nestes valores. Apesar disso, os dados de calor de diluição de Pollit et al. (2005) para a BSA, assim como os dados dos autores citados por ele, são negativos (exotérmicos) para concentrações diversas de NaCl, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Ao observar as curvas de dados brutos geradas é possível constatar que houve boa reprodutibilidade dos dados, pois o perfil obtido foi, em geral, semelhante para as três repetições.

As maiores variações foram observadas para as curvas geradas a partir da titulação da solução proteica sobre a solução tampão pura. Sob estas condições, as variações de calor são muito pequenas. Desta forma, a influência de interferentes é mais pronunciada. Estes interferentes podem ocorrer na solução, visto que as etapas de filtração e degaseificação não foram realizadas na preparação das amostras. Para ensaios com referências muito intensas também houve maiores distúrbios no sinal.

Estas hipóteses são baseadas no comportamento entálpico das interações sem considerar contribuições entrópicas e relacionadas à energia livre de Gibbs, cujos valores não são calculados neste tipo de ensaio.

5.2 Determinação do segundo coeficiente virial calorimétrico

As interações intermoleculares nos sistemas estudados foram avaliadas de acordo com os valores de segundo coeficiente virial calorimétrico encontrados para a BSA (TABELA 5.1) e para a lisozima (TABELA 5.2).

TABELA 5.1. VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2 , mL) PARA BSA SOB VÁRIAS CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÕES DE NaCl OBTIDOS POR ITC, a 25°C.

pH	0 mmol L ⁻¹	50 mmol L ⁻¹	100 mmol L ⁻¹	150 mmol L ⁻¹	500 mmol L ⁻¹	150 mmol L ⁻¹ *
	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$
4,6	1,36 ± 0,16	5,48 ± 1,15	7,57 ± 0,28	11,89 ± 0,74	34,16 ± 1,01	-10,24 ± 0,65
5,4	1,92 ± 0,48	6,31 ± 0,48	10,53 ± 0,52	13,66 ± 0,72	10,13 ± 1,68 ^a	-6,08 ± 0,51
7,4	2,05 ± 0,21 ^a	5,79 ± 0,53	9,09 ± 0,47	11,49 ± 0,41	10,98 ± 3,49	17,62 ± 2,18

*(NH₄)₂SO₄

^a Ajuste ponto a ponto

TABELA 5.2. VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2 , mL) PARA LISOZIMA SOB VÁRIAS CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÕES DE NaCl OBTIDOS POR ITC.

pH	0 mmol L ⁻¹	100 mmol L ⁻¹	200 mmol L ⁻¹	500 mmol L ⁻¹
	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$	$b_2 \cdot 10^{17}$
4,6	0,08 ± 0,00 ^a	0,54 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,43 ± 0,09 ^a
7,0	3,93 ± 0,16	-0,22 ± 0,08	-0,47 ± 0,07	-1,11 ± 0,17

^a Ajuste ponto a ponto

Conforme as expectativas, BSA e lisozima se comportaram de maneira divergente, de acordo com as alterações de pH e concentração salina. Muitas dessas diferenças podem ser justificadas pelas características da superfície destas proteínas.

Valores positivos de B_{22} indicam interações repulsivas entre as moléculas de proteína, ou seja, baixa intensidade de interações hidrofóbicas e alta intensidade de interações eletrostáticas entre o solvente e a proteína. Já valores negativos de B_{22} indicam interações atrativas entre as moléculas de proteína (GEORGE; WILSON, 1994).

As concentrações de proteína e sal são de relevância estatística dos coeficientes viriais na descrição do comportamento da solução quanto ao seu desvio da idealidade (MCBRIDE; RODGERS, 2013).

Para concentrações elevadas de proteína o terceiro coeficiente virial ainda não é suficiente, enquanto que para soluções diluídas, o segundo coeficiente virial basta. O que determinará se apenas interações entre pares de moléculas representam, significativamente, o desvio do comportamento ideal para a solução com a concentração molecular explorada é a qualidade do ajuste linear que gera B_{22} , que varia para cada metodologia empregada (VILKER et al., 1981; NICCOLI; CASTRONUOVO, 2015).

O b_2 das proteínas, nas condições avaliadas neste estudo, foi obtido conforme descrito no item 4.5, a partir do gráfico de $Q/Nk_B T$ por ρ , onde b_2 é dado pela inclinação do ajuste linear aplicado à curva (APÊNDICE 3).

A determinação do segundo coeficiente virial pela inclinação da linearização de duas variáveis também é usada para técnicas tradicionais. Para SEC-HPLC, SLS e DSL, B_{22} é obtido a partir da plotagem de K/R_θ versus c , onde K é a constante ótica ou instrumental, R_θ é o limite de Rayleigh e c é a concentração de proteína (BAJAJ et al., 2004; ASTHAGIRI et al., 2005), para SEC $\ln K_D$ versus $< C_i > [1 - K_D]$, onde C_i é a concentração de soluto e K_D é o coeficiente de distribuição de soluto (BLOUSTINE et al., 2003), e para osmometria de membranas π/C_p é plotado em função de C_p , a concentração de proteína, sendo que π/C_p é a pressão osmótica reduzida (VILKER et al., 1981)(WU; PRAUSNITZ, 1999).

Os dados de ITC foram tratados de modo a obter o segundo coeficiente virial calorimétrico (b_2 , em mL) das soluções estudadas, não sendo determinado o segundo coeficiente virial osmótico (B_{22} , em mol mL/g²), que é obtido nas demais técnicas. Para a determinação do segundo coeficiente virial osmótico seria necessária uma abordagem voltada à termodinâmica estatística, o que não foi o foco do trabalho. Portanto, é inviável a comparação entre os valores de segundo coeficiente virial (osmótico e calorimétrico). Contudo, observando os valores de b_2 e B_{22} obtidos por Chen et al. (2000), Liu et al. (2000), Chern et al. (2006) e Lin et al. (2007), os valores de b_2 representam uma tendência comparável ao B_{22} gerado.

Segundo Semenova e Dickinson (2010), a redução da repulsão proteína-proteína pode ocorrer devido à redução da carga líquida, causada por variações no pH ou na força iônica. Sabendo que estes dois fatores alteram as interações moleculares, é possível concluir que eles também alteram b_2 .

Huang et al. (2005) utilizaram o ITC para verificar a estabilidade física de interferon- $\alpha 2a$ sob diversas condições, usando apenas b_2 . Eles observaram o *salting-out* da molécula e, conseqüentemente, os valores de b_2 se tornam mais negativos. Quanto ao efeito do pH nos valores estudados (6,0 e 8,0), os valores de b_2 aumentaram, o que foi interpretado como diminuição das repulsões entre moléculas de proteína devido à proximidade do ponto isoelétrico ($pI_{\text{hrINF-}\alpha 2a}$ 5,7). Assim, o aumento de b_2 indica uma maior interação proteína-solvente, enquanto a diminuição de b_2 indica uma maior interação proteína-proteína.

Moon et al. (2000)^b calcularam que 23% da área superficial da lisozima é coberta por regiões hidrofóbicas, enquanto apenas 9% da superfície de HSA apresenta a mesma característica. Sabe-se que a HSA é mais hidrofóbica que a BSA, apesar de terem cerca de 80% da sua estrutura idêntica. Com isso, é possível afirmar que a superfície da lisozima é consideravelmente mais hidrofóbica que a da BSA.

A interferência de pH, força iônica e espécie salina, é perceptível nos dados e provoca variações importantes no comportamento das interações. Por isso, a repercussão destas variáveis foi cuidadosamente estudada e comparada com a literatura.

Contudo é preciso frisar que os mecanismos exatos de interação entre sais e proteínas são pouco compreendidos (ZHANG, 2012).

5.2.1 Efeito do pH sobre b_2

Quando o pH é alterado as características da superfície da molécula mudam. Os mecanismos de interação proteína-proteína ainda não foram elucidados, contudo é possível expor algumas considerações. No ponto isoelétrico da proteína (pI) a carga líquida da superfície é nula ($Z=0$), ou seja, é o momento em que ocorre a menor quantidade de interações eletrostáticas no sistema. Com as interações eletrostáticas prejudicadas, a hidratação dos resíduos carregados da superfície é mínima. Deste modo, as porções hidrofílicas (polares) se atraem menos intensamente e, conseqüentemente, repelem menos intensamente as partes hidrofóbicas (apolares) da superfície, permitindo que elas fiquem mais expostas.

As frações hidrofóbicas da molécula mais expostas na superfície, e a ocorrência mínima das interações eletrostáticas na superfície, favorecem as interações atrativas entre as proteínas. Todas essas alterações na superfície molecular conferem ao ponto isoelétrico o pH de menor solubilidade da proteína.

No entanto, isso não significa que a proteína será necessariamente insolúvel. No caso de proteínas com grande quantidade de resíduos polares na superfície em relação aos grupos não polares, como a BSA, ainda que a carga seja neutra, a hidrofobicidade dos grupos polares predomina, de modo que ainda ocorram interações eletrostáticas entre a proteína e o meio.

Se o pH está acima do ponto isoelétrico da proteína, a sua carga líquida é negativa, e se está abaixo deste valor, a carga líquida é positiva. Assim demonstram os dados de Vilker et al. (1981), que indicaram valores para cargas líquidas (Z) médias da BSA (pI 4,7) de acordo com o pH, sendo $Z=+4,5$ para pH 4,5, $Z=-9,1$ para pH 5,4 e $Z=-20,4$ para pH 7,4. Resultados semelhantes foram registrados por Yousef et al. (1998), que calculou $Z=+6,4$, $Z=-9,6$ e $Z=-21,6$ para pH 4,5, 5,4 e 7,4, respectivamente. Assim, ao modificar o pH serão alteradas as interações da proteína no meio. O efeito do pH sobre os valores de b_2 para a BSA é ilustrado na FIGURA 5.5.

É possível observar que o comportamento de b_2 não é uniforme. Na curva correspondente ao sistema sem sal se percebe que o menor valor de b_2 ocorre no pH 4,6, e segue aumentando de acordo com o acréscimo do pH.

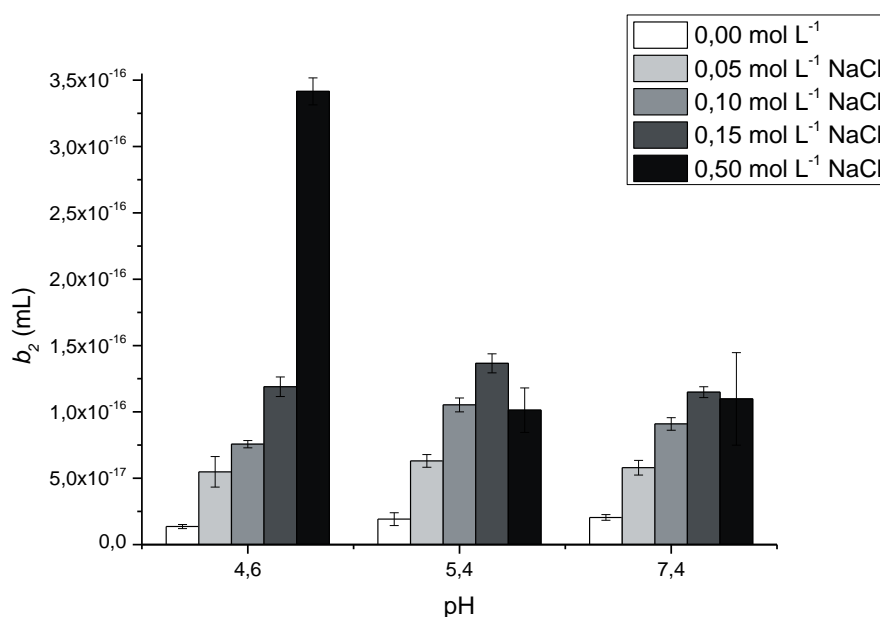


FIGURA 5.5. EFEITO DO pH SOBRE OS VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A BSA.

Nos pHs 4,6 e 5,4 a carga líquida superficial da proteína é baixa, pois estes pHs estão muito próximos do pI da proteína (4,7). Já que no pI as interações eletrostáticas são mínimas, quanto menor a carga líquida superficial da proteína, menos interações eletrostáticas ocorrem no meio, causando aumento das interações hidrofóbicas, que são expressas na redução do valor de b_2 . Como no pH 4,6 a carga líquida é, em magnitude, menor que para pH 5,4, b_2 é menor, ou seja, as condições são mais propícias à cristalização. No pH 7,4 a carga líquida da proteína é maior, causando mais interações entre a proteína e o meio, resultando em maiores valores de b_2 , e menor tendência à cristalização.

Nos estudos promovidos por Ma et al. (2015) foram encontrados resultados semelhantes para a tendência do segundo coeficiente virial osmótico. Neste trabalho os autores empregaram a técnica de CG-MALS, e observaram que, para a BSA, o segundo coeficiente virial aumentou de acordo com o acréscimo no pH ($1,13 \cdot 10^{-5}$ mol mL/g² em pH 4,64; $3,34 \cdot 10^{-5}$ mol mL/g² em pH 5,47; $7,37 \cdot 10^{-5}$ mol mL/g² em pH 7,37) sob 25 mmol L⁻¹ de NaCl – a menor concentração salina deste estudo.

Vilker et al. (1981) determinaram o segundo coeficiente virial osmótico da BSA a partir da pressão osmótica das soluções proteicas concentradas (450g/l), nos pHs 4,5, 5,4 e 7,4 a 0,15 mol L⁻¹ de cloreto de sódio para todas as soluções. Estes autores observaram que, com o aumento do pH, os valores de B_{22} aumentavam ($8,402810 \cdot 10^{-19}$ cm³/molécula para pH 4,5, passando para $8,809 \cdot 10^{-19}$ cm³/molécula em pH 5,4 e por fim $10,579 \cdot 10^{-19}$ cm³/molécula em pH 7,4). Para todos os pHs a inclinação, às baixas concentrações, e, conseqüentemente, o segundo coeficiente virial foram positivos. Contudo, o aumento não linear de π/C_p com o aumento de C_p indica que o terceiro termo da expansão virial tem contribuição significativa para a pressão osmótica às baixas concentrações. A extensão da não idealidade aumentou com o aumento do pH, que presumidamente foi mediado pelo aumento da carga líquida da BSA. Neste estudo, os dados de segundo coeficiente virial apresentaram a tendência qualitativa esperada quanto ao pH.

Nos estudos de McBride e Rodgers (2013) os valores de B_{22} para a BSA foram obtidos para uma concentração de 0,15 mol L⁻¹ de cloreto de sódio nos pHs 4,5, 5,4, 7,0 e 7,4, obtendo respectivamente os seguintes valores: $13,2 \cdot 10^{-8}$ L mol/g², $30,8 \cdot 10^{-8}$ L mol/g², $33,6 \cdot 10^{-8}$ L mol/g² e $63,5 \cdot 10^{-8}$ L mol/g². A concentração de proteína utilizada neste ensaio foi de 450g/L.

Contudo, nos ensaios realizados, o comportamento do segundo coeficiente virial calorimétrico com o aumento do pH (entre 5,4 e 7,4) não ocorre da mesma forma para as demais concentrações salinas. A 0,15 mol L⁻¹ de NaCl os valores de b_2 obtidos (FIGURA 5.5) não corresponde à tendência para a mesma concentração salina reportados por Vilker et al. (1981), McBride e Rodgers (2013) e Ma et al. (2015). Acredita-se que esta discordância está diretamente relacionada com a grande diferença de concentração de proteína na solução, aliada à concentração salina utilizada, partindo do princípio que, com menos moléculas de proteína no meio, as forças iônicas têm maior interferência.

A mesma discordância se deu com os dados obtidos por Wu e Prausnitz (1999). Estes autores avaliaram a variação de B_{22} nos pHs 4,5, 5,4 e 7,4 à altas concentrações salinas de cloreto de sódio (3 e 5 mol L⁻¹). Foi constatado que o efeito das cargas na interação proteína-proteína é muito pequeno devido à alta força iônica da solução. Além disso, neste estudo se percebeu que há desvios de B_{22} relacionados à diferença na concentração de proteínas.

Para todas as concentrações salinas utilizadas há uma tendência de que os menores valores de b_2 estejam entre os pHs 4,6 e 5,4, ou seja, a região do ponto isoelétrico.

Assim, as interações hidrofóbicas são privilegiadas em detrimento de interações eletrostáticas entre a superfície da proteína e o meio, justificando valores menores de segundo coeficiente virial calorimétrico. Quanto a este comportamento, o maior desvio ocorreu com $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. É provável que este fenômeno esteja majoritariamente dirigido pela ação da concentração salina (discutida na seção 5.2.2).

Outra observação pertinente para a BSA é que todos os valores de b_2 medidos (com e sem NaCl), independente do pH, foram positivos, indicando que mesmo sob condições que favorecem as interações hidrofóbicas (quanto ao pH), as interações eletrostáticas com a água são predominantes. Esta consideração resulta da baixa tendência de agregação, o que é comprovado diversas vezes na literatura por dados de segundo coeficiente virial (VILKER et al., 1981; GEORGE; WILSON, 1994; LU et al., 2009).

Moon et al. (2000)^b determinaram os valores do segundo coeficiente virial osmótico para a BSA e constataram que para todas as condições experimentais (pH 4 - 8), B_{22} é positivo, indicando repulsão entre as moléculas de BSA no meio e interação entre as moléculas de proteína e o meio (solvatação).

Quanto à lisozima, houve uma tendência de redução do b_2 em função do pH, como pode ser observado na FIGURA 5.6.

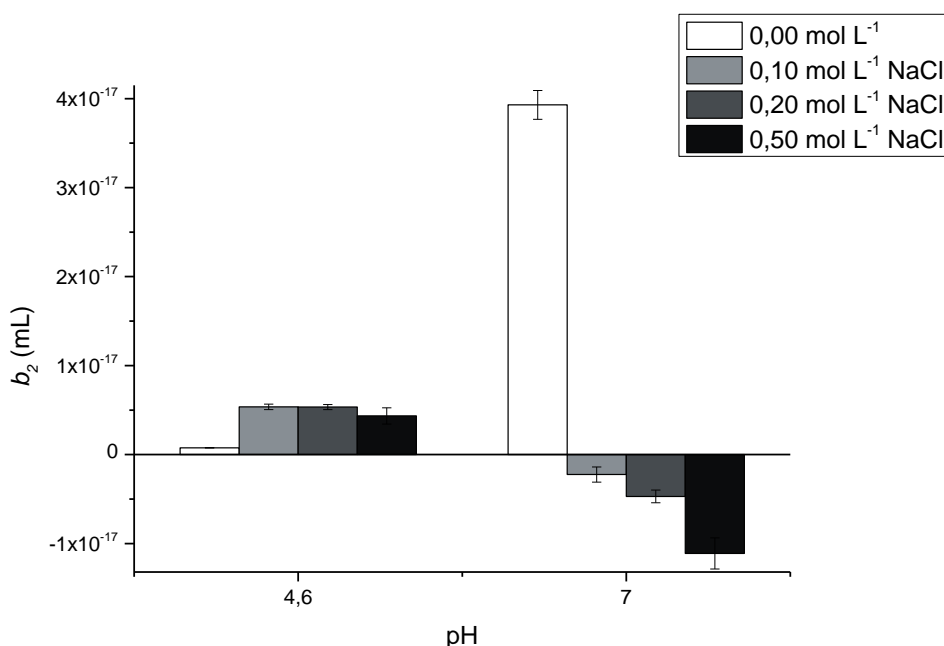


FIGURA 5.6. EFEITO DO pH SOBRE OS VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A LISOZIMA.

Uma vez que houve mudança de sinal do b_2 , com o aumento do pH (de 4,6 para 7,0), sugere-se que as interações entre as moléculas de proteína se tornaram mais atrativas com o aumento do pH do meio, ou seja, as moléculas têm maior facilidade de agregação e consequentemente, de cristalização em pH 7,0 do que em pH 4,6.

Isso pode ser explicado de acordo com proximidade do ponto isoeletrico da lisozima (11,4). No pH 4,6 a carga líquida da superfície da lisozima é positiva e alta, o que sugere uma grande quantidade de interações eletrostáticas acontecendo entre a proteína, íons e água. Ao modificar o pH para 7,0, mais próximo do pH 11,4, a carga líquida superficial ainda é positiva, pois o pH é menor que pI, mas tem magnitude menor, sugerindo que ainda ocorrem muitas interações eletrostáticas, mas com menor intensidade do que para pHs mais baixos. Assim como para as demais proteínas, no pH isoeletrico, as interações de solvatação e hidratação atingem seu valor mínimo. Com isso, ocorre a maior exposição de grupos apolares da superfície, favorecendo as interações hidrofóbicas, ou seja, as interações atrativas proteína-proteína, aumentando a possibilidade de cristalização.

Houve um desacordo desta tendência para os sistemas sem sal, para os quais houve aumento de b_2 . É possível que essa discordância tenha ocorrido pela diferença de composição destes sistemas. É importante lembrar que para trabalhar com o pH 4,6 para a lisozima foi usado tampão acetato, enquanto para pH 7,0 foi usado o tampão Tris-HCl.

Utilizar soluções tampão diferentes se faz necessário quando se deseja avaliar uma faixa de valores de pH. Contudo isto pode adicionar variáveis desconhecidas ao sistema, podendo alterar a solubilidade das proteínas (RETAILLEAU et al., 1997).

Supõe-se que as diferenças de valores de segundo coeficiente virial calorimétrico que ocorreram em decorrência da composição do meio sejam mais evidentes para concentrações salinas nulas. Quando se adicionou sal ao meio, estas influências foram reduzidas, formando um grupo de dados que tem mais correspondências entre si. Acredita-se que usar tampões em baixa concentração para fazer comparações entre amostras com tampões diferentes, como foi realizado neste estudo para a lisozima, é determinante, pois reduz a influência dos íons próprios do tampão sobre a amostra.

Há diversos estudos para determinação do segundo coeficiente virial da lisozima em função do pH. A literatura consultada confirma os resultados obtidos, considerando sempre que a comparação entre B_{22} e b_2 é qualitativa.

Velev et al. (1998) avaliaram o efeito do pH sobre B_{22} da lisozima utilizando SLS e SANS. Eles concluíram que a baixas forças iônicas, B_{22} dependem fortemente do pH, assim como foi observado neste trabalho, além de mudarem de positivos para negativos com o aumento do pH.

Empregando SIC, Tessier et al. (2002) estudaram o efeito do pH sobre a lisozima num amplo intervalo (3-9). Os valores de B_{22} encontrados foram $4,40 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$, $3,31 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$, $2,12 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$, $-0,41 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ e $-3,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ para os pHs 3,0, 4,5, 6,0, 7,0 e 9,0, respectivamente, comprovando a tendência de redução de valores.

No trabalho desenvolvido por Elcock e McCammon (2001) foi medido o B_{22} para soluções a 100 mmol L^{-1} de NaCl ($3,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$, $-2,46 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ e -

$4,41 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ para os pHs 3, 6 e 9, respectivamente), e a 300 mmol L^{-1} de NaCl ($1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$, $-3,60 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ e $-5,28 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ para os pHs 3, 6 e 9, respectivamente). Independente da concentração de sal, o B_{22} decresceu conforme o aumento do pH e aproximou do ponto isoelétrico.

Moon et al. (2000)^a avaliou por osmometria de membranas o efeito do pH sobre B_{22} da lisozima. Para os pHs estudados (4, 7 e 8) os valores de segundo coeficiente virial obtidos em solução 1 mol L^{-1} de sulfato de amônio foram $-0,042 \text{ m}^3/\text{mol}$, $-0,057 \text{ m}^3/\text{mol}$ e $-0,089 \text{ m}^3/\text{mol}$, respectivamente. Os autores observaram que B_{22} é negativo sempre, e aumenta em magnitude com o pH, independente da natureza do sal e da força iônica estudadas.

A partir destas discussões, entende-se que quanto mais próximo o pH está do ponto isoelétrico da proteína, menor é a quantidade de interações entre proteína e solvente (consideradas as interações eletrostáticas), e mais interações entre as proteínas (interações hidrofóbicas) ocorrem. Portanto, desconsiderando efeitos de força iônica, o segundo coeficiente virial calorimétrico é menor para regiões mais próximas dos pontos isoelétricos da proteína e aumenta com o afastamento deste valor de pH. Os resultados para o b_2 obtidos neste estudo apresentaram o mesmo comportamento de B_{22} , relatado na literatura, quanto ao efeito do pH.

5.2.2 Efeito da concentração salina sobre b_2

Ao alterar a concentração de um sal, em uma solução, a propriedade modificada é a força iônica, que depende da concentração do eletrólito e da sua valência. Segundo Fennema et al. (2010), forças iônicas baixas neutralizam as cargas da superfície das proteínas. Este evento pode ter influências diferentes de acordo com a proteína, variando conforme as características da carga superficial da molécula.

Nos dados do segundo coeficiente virial calorimétrico obtido neste estudo, os efeitos das alterações na concentração de sal para a BSA podem ser observados na FIGURA 5.7.

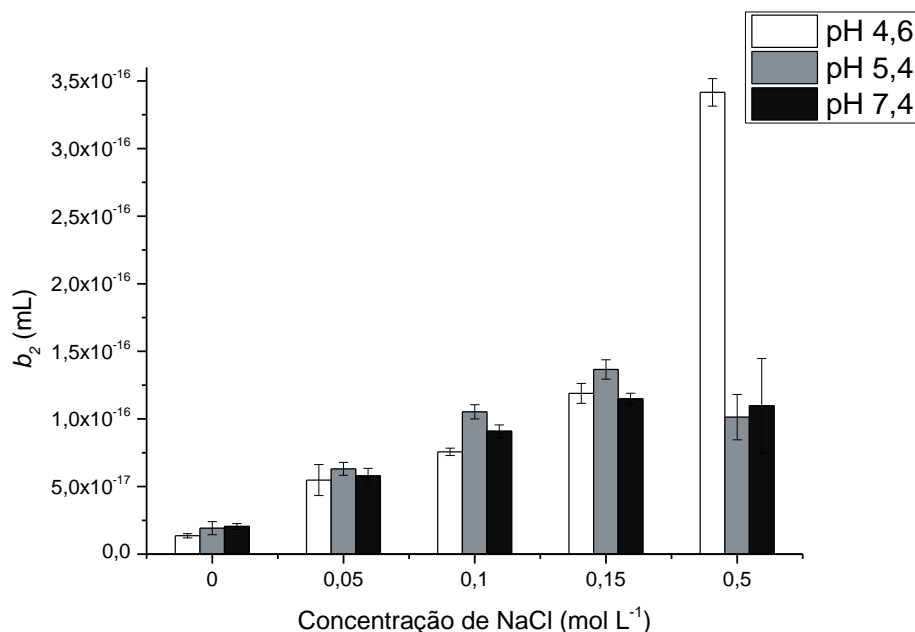


FIGURA 5.7. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE O SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A BSA.

Houve um acréscimo no b_2 com a concentração salina até a concentração de 0,15 mol L⁻¹ de NaCl para todos os pHs, sugerindo aumento nas interações eletrostáticas proteína-solvente, onde os íons adicionados atuam na superfície polar, aumentando a hidratação da molécula. Este fenômeno resulta no aumento da solubilidade e é chamado de *salting-in*.

Segundo Scopes (1988), enquanto o *salting-in* está relacionado com a carga da superfície polar da molécula de proteína, o *salting-out* é altamente dependente das partes hidrofóbicas da molécula.

Com o aumento da concentração salina, observa-se dois comportamentos distintos: um para o pH 4,6 (onde a carga líquida da superfície é positiva), e outro para pHs 5,4 e 7,4 (onde a carga líquida da superfície da proteína é negativa).

Para o pH 4,6, aonde a superfície de BSA é carregada positivamente (abaixo do ponto isoelétrico) e com muitos resíduos polares, o aumento de íons no meio faz com que as interações eletrostáticas entre a proteína e o meio seja intensificadas, de modo que b_2 seja positivo e alto.

Já para os pHs 5,4 e 7,4, condições nas quais a carga líquida da superfície da proteína é negativa (acima do ponto isoelétrico), o efeito dos ânions nas soluções proteicas é geralmente mais intenso que o do cátion, segundo Curtis e Lue (2006).

Desta forma, sugere-se que quando o ânion se aproxima da superfície polar carregada, negativamente, ocorre a repulsão. Como há grandes porções polares carregadas negativamente, a repulsão entre o ânion e a superfície da proteína é intensa.

Assim, os íons passam a competir com a proteína por moléculas de água, de modo que as interações hidrofóbicas sejam favorecidas, resultando em valores menores de b_2 .

Moon et al. (2000)^b determinou o B_{22} para a BSA para quatro condições de pH e duas condições de concentração salina. O comportamento dos valores de B_{22} não foi o mesmo que o encontrado neste estudo, sendo levemente decrescente. Esta diferença de tendência pode ter acontecido por conta da alta concentração salina usada por esses autores ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Outro ponto a ser observado no estudo de Moon e seus colaboradores é que o B_{22} diminui com menor intensidade para pH 4,0 do que para pHs acima do ponto isoeletrico. No pH 4,0 (superfície carregada positivamente) B_{22} diminui de $0,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ para $0,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ com o aumento da concentração de sal (de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para $3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Já nos pHs 6,0, 7,0 e 8,0 este decréscimo é de $0,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ para $0,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$, $0,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ para $0,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ e $0,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$ para $0,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL/g}^2$, respectivamente. A partir disto, pode-se sugerir que o aumento da concentração salina tem menor efeito em superfícies carregadas positivamente (abaixo do pI) do que em superfícies carregadas negativamente (acima do pI). Este efeito pode ser atribuído à melhor acomodação dos ânions do sal nas superfícies carregadas positivamente.

Os resultados de segundo coeficiente virial calorimétrico para a lisozima em relação ao efeito da concentração de cloreto de sódio estão ilustrados na FIGURA 5.8.

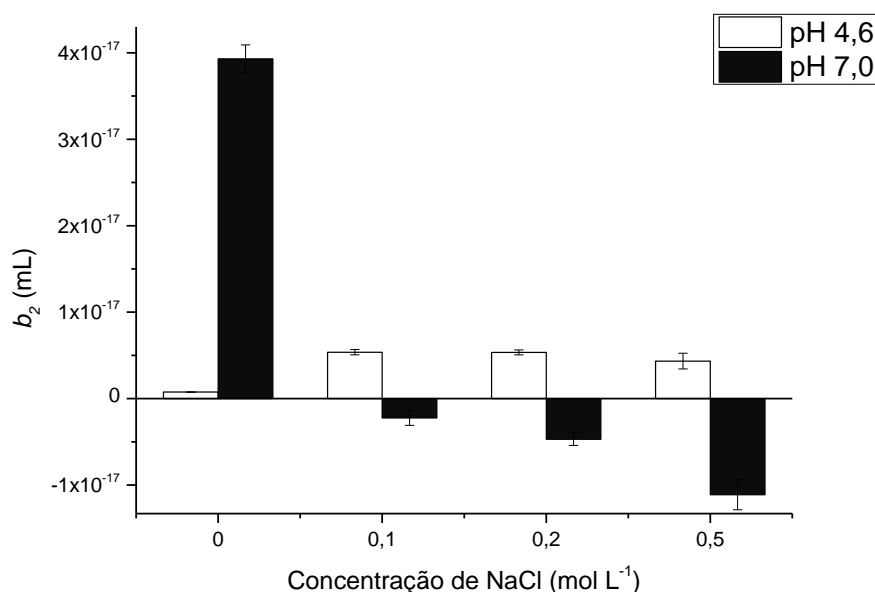


FIGURA 5.8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE OS VALORES DE SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) PARA A LISOZIMA.

A discussão dos dados parte do fato de que a composição do tampão altera as interações das proteínas, como citado no item 5.2.1, e que esta interferência é reduzida ao

adicionar sais ao meio. Portanto, é válido desconsiderar o segundo coeficiente virial calorimétrico referente ao sistema livre de sal.

É possível afirmar que houve uma redução do segundo coeficiente virial calorimétrico conforme o aumento da força iônica do meio, diferentemente da BSA, que apresentou aumento de b_2 , devido ao *salting-in*.

Supõe-se que na lisozima com a superfície carregada positivamente (abaixo de pI), as interações intermoleculares se tornam mais atrativas com a adição de sais. O efeito de íons neste caso é considerado dominante (ZHANG, 2012).

De acordo com Rosenbaum e Zukoski (1996), o decréscimo de B_{22} com o aumento da força iônica é correspondente ao acréscimo da força das interações atrativas entre as moléculas de proteína.

A ausência de *salting-in* para a lisozima é confirmada nos estudos de solubilidade de Retailleau et al. (1997), que determinou esta propriedade para a lisozima numa ampla faixa de pH (3 – 9) e com variações na concentração de NaCl (0,0 – 1,2 mol L⁻¹). Este estudo foi realizado na ausência de tampões, de forma a evitar possíveis interferências destes na solubilidade. Os autores constataram que não ocorre aumento da solubilidade com o incremento da força iônica em nenhum pH. Assim como também o aumento de interações hidrofóbicas ocorre mais intensamente à baixas forças iônicas (maior inclinação da curva).

Uma possível explicação para o *salting-out* para soluções salinas concentradas é a possibilidade dos íons provenientes do sal e a superfície da proteína passarem a “competir” pelas mesmas moléculas de água durante a hidratação. Se a interação entre os íons do sal com a água é muito forte a superfície da proteína tende a desidratar, e as moléculas de proteína passam a interagir entre si (MOON et al., 2000)^b.

Bloustine et al. (2003) estudaram como a concentração salina (cloreto de sódio) interfere no B_{22} determinado por SEC para lisozima em pH 6,2. Foi constatado que o valor do segundo coeficiente virial passa de positivo para negativo com o aumento da concentração de cloreto de sódio ($2,4 \cdot 10^{-4}$ mL mol/g² para 0 mmol L⁻¹, $1,6 \cdot 10^{-4}$ mL mol/g² para 50 mmol L⁻¹ e $-1,0 \cdot 10^{-4}$ mL mol/g² para 150 mmol L⁻¹), indicando aumento das interações atrativas entre moléculas de proteína.

Tessier et al. (2002) mediram o B_{22} da lisozima por SIC sob uma variedade de concentrações salinas. Para estes autor, valores de segundo coeficiente virial em pH 4,5 foram positivos até a concentração de cloreto de sódio próxima a 0,40 mol L⁻¹. Estes autores ainda comparam o segundo coeficiente virial, para as mesmas condições a partir de diferentes técnicas. Os mesmos concluíram que o SIC é um método qualitativo de medir este parâmetro, assim como a obtenção de b_2 por ITC.

Narayanan e Liu (2003) mediram o B_{22} da lisozima por SLS e DLS em pH 4,6 sob condições salinas extremas: 8,6 mmol L⁻¹ e 860 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio. Os

autores concluíram que em baixas concentrações de eletrólitos o B_{22} era positivo, indicando interações repulsivas entre as proteínas. Entretanto, quando a concentração de sal era elevada, B_{22} se tornou negativo e de acordo com a janela de cristalização de George e Wilson (1994).

Moon et al. (2000)^b obteve valores de B_{22} para a lisozima com concentrações de 40g/L sob efeito de sulfato de amônio em força iônica 1 a 3 mol L⁻¹ nos pHs 4, 6, 7 e 8. Para a lisozima, B_{22} iniciou negativo, indicando que as interações entre moléculas de lisozima eram atrativas, tornando-se mais negativo com o aumento do pH e da força iônica.

Nos estudos de Bajaj et al. (2004) empregando SEC-HPLC foi avaliado o efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a lisozima em pH 4,6. Os resultados obtidos foram $2,6 \cdot 10^{-4}$ mol ml/g², $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol ml/g², $-1,8 \cdot 10^{-4}$ mol ml/g² e $-3,0 \cdot 10^{-4}$ mol ml/g² para 40 mmol L⁻¹, 150 mmol L⁻¹, 400 mmol L⁻¹ e 1,14 mol L⁻¹ de NaCl, respectivamente. Assim como nos resultados obtidos neste trabalho, há uma tendência de diminuição de B_{22} , ou seja, maior promoção de interações hidrofóbicas com o aumento da concentração salina no meio.

No trabalho desenvolvido por McBride e Rodgers (2013) foi constatado que o segundo coeficiente virial é uma função de interações entre solvente e soluto, bem como as concentrações das espécies em solução. De forma análoga, é possível constatar que o segundo coeficiente virial é dependente da força iônica, do pH das soluções proteicas, e das características de proteína e eletrólitos envolvidos.

5.2.3 Efeito da espécie salina

Em soluções, os sais têm diversas funções. São usados para controlar pH, força iônica e osmolalidade, entre outras. Por este motivo, é importante entender como os sais modulam as interações entre proteínas, como afetam o comportamento das soluções, e como atuam nos processos de precipitação, cristalização e estabilização das proteínas (ZHANG, 2012).

Wu e Prausnitz (1999) e Moon et al. (2000)^b reportaram que a variação do B_{22} de proteínas é dependente do tipo de sal e do meio. Entretanto, de acordo com Curtis e Lue (2006), não há modelo teórico que explique as interações proteína-proteína em soluções salinas sob a grande variedade de condições experimentais possíveis.

Um dos ensaios, realizados neste estudo, propôs a avaliação do b_2 em função da natureza do sal no sistema. Esta abordagem se faz necessária porque ainda há uma lacuna

para compreender os mecanismos de ação dos diferentes sais em proteínas, e até mesmo de dados experimentais.

A BSA foi utilizada para este fim, aliada às soluções de sulfato de amônio 0,15 mol L⁻¹ nos pHs 4,6, 5,4 e 7,4, conforme ilustra a FIGURA 5.9. Não foi possível avaliar o efeito da concentração salina, tendo em vista que apenas o pH foi alterado.

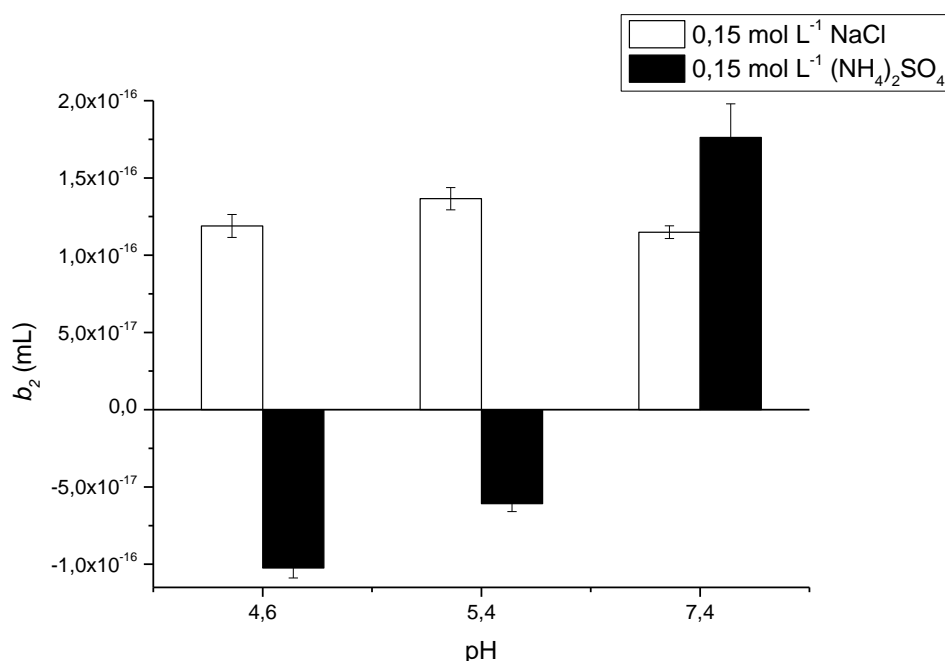


FIGURA 5.9. EFEITO DO pH SOBRE O SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL CALORIMÉTRICO (b_2) DA BSA PARA NaCl E (NH₄)₂SO₄.

Ao avaliar b_2 para sulfato de amônio, percebe-se que há uma tendência de acréscimo em função do pH, indicando o aumento de interações entre a proteína e o meio, com o distanciamento do ponto isoelétrico da proteína.

Moon et al. (2000)^b obtiveram os valores do segundo coeficiente virial osmótico para a BSA com sulfato de amônio e perceberam a tendência de aumento da magnitude de B_{22} com o pH (pH 4 - 8). Desta forma, para este sal, foi observada mesma tendência de B_{22} e b_2 deste estudo. B_{22} foi positivo para estes autores, indicando repulsão entre as moléculas de BSA no meio e interação entre as moléculas de proteína e o meio (solvatação). Este comportamento não foi refletido nos ensaios para b_2 . É possível que esta divergência tenha ocorrido porque, nos estudos de Moon et al. (2000)^b, a menor concentração utilizada seja 1 mol L⁻¹ de sulfato de amônio, enquanto a concentração deste estudo foi 0,15 mol L⁻¹. Esses dados podem ser correlatos se a tendência de b_2 com o aumento da concentração salina for crescente.

A concentração de sulfato de amônio, utilizada neste estudo, é insuficiente para promover a cristalização. Na literatura, constam valores muito mais altos de concentração para este fim. É comum autores avaliarem o B_{22} da BSA com 0,8 mol L⁻¹, 1,5 mol L⁻¹, 2,13 mol L⁻¹, 2,5 mol L⁻¹ de sulfato de amônio (GEORGE; WILSON, 1994; ASANOV et al., 1997; WU; PRAUSNITZ, 1999)

Lu et al. (2009) empregaram a osmometria de membranas para determinar o B_{22} da BSA sob diversos valores de pH (4,5, 4,8, 5,4 e 7,4) com sulfato de amônio (0,15 mol L⁻¹, 0,50 mol L⁻¹, 1,00 mol L⁻¹ e 1,50 mol L⁻¹). A orientação de B_{22} observada para 0,15 mol L⁻¹ de sal é aumentar conforme o pH se afasta do ponto isoelétrico, para ambos os sentidos. Os valores de B_{22} encontrados foram $-0,2596 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g² para pH 4,5, $-0,2631 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g² para pH 4,8, $-0,0948 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g² para pH 5,4 e $-0,0310 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g² para pH 7,4, corroborando com os valores de b_2 deste estudo. Isso indica que próximo ao pH isoelétrico da proteína, há maior possibilidade de agregação proteica.

5.3 Relação entre solubilidade e b_2

Sabe-se que conhecer a solubilidade das macromoléculas é um pré-requisito para controlar as condições de cristalização. Contudo, as bases teóricas da solubilidade são ainda controversas, sobretudo quanto aos efeitos de sais e, por este motivo, os dados sobre a solubilidade quase sempre se originam de determinações experimentais. Apesar do surgimento de novos métodos para este fim, a complexidade do comportamento da solubilidade é demonstrada, também, experimentalmente (AZEVEDO JR., 2004).

Não foi possível obter os dados de solubilidade para a lisozima e para a BSA experimentalmente. Contudo foram abordados alguns estudos que relacionam a solubilidade da lisozima com o segundo coeficiente virial, e a relação que esta propriedade tem com o segundo coeficiente virial calorimétrico, conforme a sua significância física. A mesma abordagem não foi realizada para a BSA devido ao fato desta proteína ser altamente solúvel, não havendo informações objetivas sobre a sua solubilidade correlacionada ao B_{22} na literatura consultada.

A relação, entre o segundo coeficiente virial e a solubilidade, foi estabelecida por George e Wilson (1994), que desenvolveram um estudo notável e muito utilizado para selecionar as condições de cristalização de determinadas proteínas. Segundo estes autores, valores positivos de B_{22} são características da alta solubilidade. Quando os valores de B_{22} se tornam negativos é sinal de que a solubilidade está sendo reduzida. Se o valor de B_{22} está dentro dos limites estabelecidos pela “janela de cristalização”, haverá formação de frações insolúveis estruturadas, ou seja, os cristais. Se os valores de B_{22} estão abaixo do mínimo determinado, haverá formação de frações insolúveis, mas a maior probabilidade é de que estas sejam desordenadas, ou seja, formando precipitados ao invés de cristais. Se o valor de B_{22} está acima do limite superior, não haverá cristalização e a proteína continuará em equilíbrio no meio (GEORGE; WILSON, 1994). Depois deste estudo, diversos autores realizaram pesquisas para comprovar ou refutar o pressuposto da “janela de cristalização” (ROSENBAUM; ZUKOSKI, 1996; BONNETÉ et al., 1999; GUO et al.,

1999; HAAS et al., 1999; TESSIER; LENHOFF, 2003; AHAMED et al., 2005; MÖLLER et al., 2012; MEDEIROS, 2013; WILSON; DELUCAS, 2014).

A solubilidade tem uma alta relação com o B_{22} para soluções proteicas. A correlação parece ser geral, no sentido de que, mudanças provocadas na solubilidade, foram refletidas por alterações em B_{22} para diversas variáveis da solução, tais como, pH, temperatura e tipo de agente de cristalização e concentração (GUO et al., 1999).

Para a lisozima, foi relatado no item 5.2.1 que, com a alteração de pH do 4,0 para 7,0, os valores de segundo coeficiente virial calorimétrico são reduzidos, o que indica o aumento da possibilidade de interações proteína-proteína, resultando na agregação.

Quanto às consequências da variação na concentração salina sobre os valores de b_2 , descritas na seção 5.2.2, o reflexo foi que, com o acréscimo de cloreto de sódio no meio, houve decréscimo de b_2 , sugerindo maior quantidade de interações hidrofóbicas no meio, ou seja, reduzindo a solubilidade.

Guo et al. (1999) desenvolveu uma correlação empírica entre valores de segundo coeficiente virial e solubilidade para a ovoalbumina e a lisozima. Foram utilizados o tampão acetato de sódio e o cloreto de sódio, como agente de cristalização, como condições do meio na determinação dos valores de segundo coeficiente virial por SLS a 25°C. Com o aumento da concentração de sal de 2,0% (aproximadamente 0,3 mol L⁻¹) para 7,0% (em torno de 1,1 mol L⁻¹) em pH 4,2 os valores de B_{22} foram de $0,1 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g² para $-7,4 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g². Esta redução, segundo os autores, significa o aumento de interações atrativas entre as moléculas de proteína. A solubilidade (dados da literatura), que variou de 55,8 mg/mL para 2,1 mg/mL.

Estes mesmos autores variaram o pH da lisozima (4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 5,2 e 5,4) sob a mesma concentração de NaCl (2%). Os valores de B_{22} variaram de $-0,1 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g² para pH 4,0 até $-2,8 \cdot 10^{-4}$ mol mL/g² para pH 5,4. Os valores de solubilidade para estas condições foram de 48,7 para 17,6 mg/mL.

Haas et al. (1999) elaboraram uma relação teórica para relacionar B_{22} e a solubilidade. Segundo os autores, a correlação descreve com precisão os dados empíricos. A relação obtida por estes autores é ilustrada na FIGURA 5.10, que mostra que o aumento da solubilidade ocorre quando os valores de B_{22} aumentam. Os pontos indicados são para a lisozima, sob diversos pHs e concentrações salinas. Os valores de segundo coeficiente virial e solubilidade foram obtidos da literatura.

Estas relações têm diferenças entre si na fundamentação. No entanto, chegaram à mesma conclusão: o aumento da solubilidade é descrito em termos de segundo coeficiente virial para a lisozima pelo aumento dos valores deste parâmetro.

Comparando qualitativamente os valores de segundo coeficiente virial, obtidos por Guo et al. (1999) e Haas et al. (1999), a tendência de redução dos valores corresponde ao comportamento observado para o segundo coeficiente virial calorimétrico obtidos

neste trabalho. Estes autores, relacionaram o abaixamento do B_{22} com a redução da solubilidade.

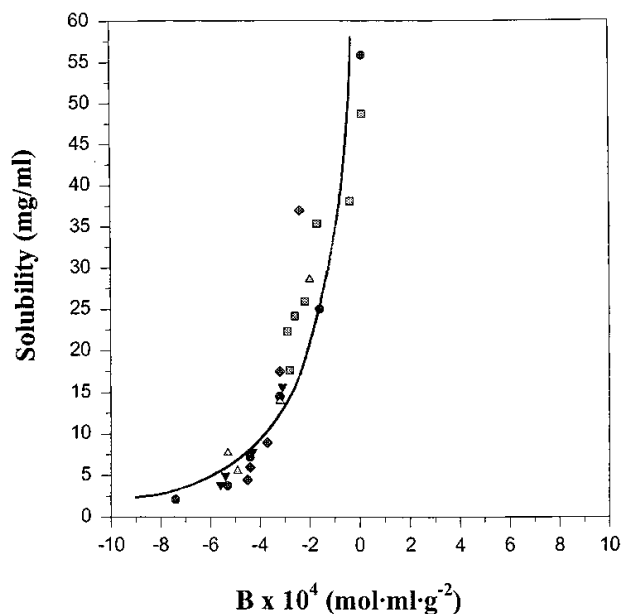


FIGURA 5.10. DADOS DE SOLUBILIDADE (S, EM mg/mL) EM FUNÇÃO DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL (B) PARA A LISOZIMA.

Fonte: Haas et al. (1999).

A relação entre a redução de B_{22} e b_2 é a mesma: aumento do pH para valores mais próximos ao ponto isoelétrico da lisozima e aumento da concentração de cloreto de sódio. Desta forma, é possível correlacionar o segundo coeficiente virial calorimétrico com a solubilidade da mesma maneira: o aumento da solubilidade, resultado da redução das interações hidrofóbicas e aumento das interações eletrostáticas, entre o meio e a superfície da proteína, é refletido no aumento dos valores de b_2 .

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

A possibilidade de aplicação da calorimetria de titulação isotérmica para obtenção do segundo coeficiente virial calorimétrico de proteínas foi estudada neste trabalho. Este parâmetro termodinâmico está relacionado ao segundo coeficiente virial osmótico, que é importante na compreensão dos fenômenos de agregação e cristalização de proteínas em solução.

O calor de diluição por ITC, para a BSA e a lisozima, sob condições variadas de pH e concentração de sais (cloreto de sódio para ambas as proteínas, e sulfato de amônio apenas para a BSA), mostrou ser um dado de simples obtenção e passível de fornecer diversas informações. Quando submetidas às mesmas concentrações salinas, os valores de calor de diluição da lisozima foram sempre inferiores aos obtidos para a BSA. A partir deste dado e considerando as características termodinâmicas, das possíveis interações no meio, foi possível inferir, sobretudo, que a lisozima é mais propensa à agregação do que a BSA. Tal afirmação é ratificada pela literatura.

Com fundamento no calor de diluição, foi obtido o segundo coeficiente virial calorimétrico (b_2). Parâmetro, este, que mostrou-se intensamente relacionado com as interações intermoleculares do meio.

Para a BSA, o b_2 apontou a intensa interferência do pH, da concentração de sal e da natureza do sal, sobre as interações moleculares. Relacionada à característica da superfície molecular, a interação entre proteínas mostrou ser improvável para todos os pHs, devido ao valor positivo de b_2 . O aumento dos valores de b_2 , devido ao aumento da concentração de cloreto de sódio (até 0,50 mol L⁻¹), foi interpretado como o fenômeno de *salting in* na BSA. Contudo, a presença de sulfato de amônio provocou valores muito menores de b_2 , mostrando que este sal é mais eficiente na cristalização da BSA. Estas informações foram confirmadas na literatura e a tendência do segundo coeficiente virial osmótico foi a mesma que a do segundo coeficiente virial calorimétrico.

Para a lisozima foi observada a interferência da constituição da solução tampão nos valores de b_2 para a condição sem adição de cloreto de sódio, nos pHs 4,0 e 7,0. Porém, sugere-se que este efeito foi minimizado com a adição de sais ao meio. Foi observado o *salting out* da proteína, refletido pela diminuição constante de b_2 com o aumento da concentração salina e a aproximação do pH isoeletrico (11,4). A ausência de *salting in* foi confirmada pela literatura e a tendência observada para os valores de segundo coeficiente virial osmótico foi semelhante à obtida para b_2 .

Ao relacionar o segundo coeficiente virial calorimétrico com a solubilidade, por meio de modelos da literatura para a lisozima, foi possível observar que a relação entre B_{22} e b_2 com esta propriedade é a mesma: quanto maior o valor do coeficiente, mais solúvel a proteína está e menos interações hidrofóbicas, entre as moléculas de proteína, ocorrem no sistema. De forma análoga, quanto menor for o valor de B_{22} e b_2 , menos solúvel será a proteína e mais interações entre as moléculas de proteína ocorrem no meio.

Portanto, é possível supor que o segundo coeficiente virial calorimétrico, obtido neste, estudo apresentou significância física quanto aos sistemas estudados, assim como, o segundo coeficiente virial osmótico. Isto significa que, quanto menor o valor de b_2 , mais favorável é a interação molecular para que ocorra a cristalização e a precipitação e, quanto maior o valor de b_2 , menos propícia à agregação e separação das proteínas. Assim, a calorimetria de titulação isotérmica mostrou-se uma ferramenta válida no estudo das interações intermoleculares entre proteínas, podendo contribuir para aumento da compreensão do fenômeno de cristalização proteica.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Considerando os resultados obtidos neste estudo, é possível elaborar algumas sugestões para a sua continuidade. São elas: realizar uma abordagem sob o ponto de vista da termodinâmica estatística do segundo coeficiente virial calorimétrico para obter o segundo coeficiente virial, e realizar uma comparação quantitativa com a literatura; obter o b_2 para soluções proteicas sob condições nas quais ocorre cristalização e nas quais ocorre precipitação, e comparar os resultados; e estabelecer uma relação direta entre b_2 e a “janela de cristalização” de George e Wilson (1994).

REFERÊNCIAS

- AHAMED, T.; OTTENS, M.; DEDEM, G. W. K. VAN; WIELEN, L. A. M. VAN DER. Design of self-interaction chromatography as an analytical tool for predicting protein phase behavior. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1-2, p. 111–124, 2005.
- ASANOV, A. N.; DELUCAS, L. J. L.; OLDHAM, P. P. B.; WILSON, W. W. W. Interfacial Aggregation of Bovine Serum Albumin Related to Crystallization Conditions Studied by Total Internal Reflection Fluorescence. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 196, p. 62, 1997.
- ASTHAGIRI, D.; PALIWAL, A.; ABRAS, D.; LENHOFF, A. M.; PAULAITIS, M. E. A Consistent Experimental and Modeling Approach to Light-Scattering Studies of Protein-Protein Interactions in Solution. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3300, 2005. Elsevier.
- AZEVEDO JR., W. F. DE. **Cristalização de macromoléculas biológicas**. São José do Rio Preto, 2004.
- BAJAJ, H.; SHARMA, V. K.; KALONIA, D. S. Determination of Second Virial Coefficient of Proteins Using a Dual-Detector Cell for Simultaneous Measurement of Scattered Light Intensity and Concentration in SEC-HPLC. **Biophysical Journal**, v. 87, n. 6, p. 4048, 2004.
- BARONE, G.; GIANCOLA, C.; VERDOLIVA, A. DSC studies on the denaturation and aggregation of serum albumins. **Thermochimica Acta**, v. 199, p. 197–205, 1992.
- BLOUSTINE, J.; BEREJNOV, V.; FRADEN, S. Measurements of protein-protein interactions by size exclusion chromatography. **Biophysical journal**, v. 85, n. 4, p. 2619–23, 2003.
- BONNETÉ, F.; FINET, S.; TARDIEU, A. Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions. **Journal of Crystal Growth**, v. 196, n. 2-4, p. 403–414, 1999.
- BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. **Drug Discovery Today**, 2012.
- CHANPHAI, P.; BEKALE, L.; TAJMIR-RIABI, H. A. Effect of hydrophobicity on protein-protein interactions. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 224–231, 2015.
- CHATTORAJ, D. .; CHATTERJEE, R. Virial coefficients and intermacromolecular attraction of proteins in solution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 54, n. 3, p. 364–374, 1976.
- CHEN, W. Y.; KUO, C. S.; LIU, D. Z. Determination of the second virial coefficient of the interaction between microemulsion droplets by microcalorimetry. **Langmuir**, v. 16, n. 2, p. 300–302, 2000.
- CHERN, C.-S.; CHEN, W.-Y.; CHIU, H.-C.; et al. Interactions between amphiphilic graft

copolymer-intercalated liposomes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 277, n. 1-3, p. 44–51, 2006.

CURTIS, R. A.; LUE, L. A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 907–923, 2006.

DESZCZYNSKI, M.; HARDING, S. E.; WINZOR, D. J. Negative second virial coefficients as predictors of protein crystal growth: Evidence from sedimentation equilibrium studies that refutes the designation of those light scattering parameters as osmotic virial coefficients. **Biophysical Chemistry**, v. 120, p. 106–113, 2006.

DRACZKOWSKI, P.; MATOSIUK, D.; JOZWIAK, K. Isothermal titration calorimetry in membrane protein research. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 313–325, 2014. Elsevier B.V.

DUMETZ, A. C.; CHOCKLA, A. M.; KALER, E. W.; LENHOFF, A. M. Effects of pH on protein-protein interactions and implications for protein phase behavior. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1784, n. 4, p. 600–610, 2008.

ELCOCK, A H.; MCCAMMON, J. A. Calculation of weak protein-protein interactions: the pH dependence of the second virial coefficient. **Biophysical journal**, v. 80, n. 2, p. 613–625, 2001.

EVANS, D. R. H.; ROMERO, J. K.; WESTOBY, M. Chapter 9 Concentration of Proteins and Removal of Solutes. **Methods in Enzymology**, v. 463, n. C, p. 97–120, 2009.

FELTRE, R. **Físico-Química**. 2nd ed. São Paulo: Editora Moderna, 1983.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMONDARAM, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. **Química de Alimentos de Fennema**. 4th ed., p.900, 2010. Porto Alegre: Artmed.

FRANCO, L. F. M.; PESSÔA FILHO, P. A. DE. On the relationship between the solubility of proteins and the osmotic second virial coefficient. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **Anais...** . v. 30, p.95–104, 2013.

GEORGE, A; WILSON, W. W. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 50, n. Pt 4, p. 361–5, 1994.

GORDON, N. F.; MOORE, C. M. V; COONEY, C. L. An overview of continuous protein purification processes. **Biotechnology Advances**, v. 8, n. 4, p. 741–762, 1990.

GROLIER, J. P. E.; RÍO, J. M. DEL. Isothermal titration calorimetry: A thermodynamic interpretation of measurements. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 55, p. 193–202, 2012.

GROLIER, J.-P. E. From Solutions to Polymers: A High Temperature–High Pressure Journey in Experimental Thermodynamics. **Journal of Solution Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1090–1120, 2015.

GROLIER, J.-P. E.; RÍO, J. M. DEL. On the physical meaning of the isothermal titration calorimetry measurements in calorimeters with full cells. **International journal of molecular sciences**, v. 10, p. 5296–5325, 2009.

GUO, B.; KAO, S.; MCDONALD, H.; et al. Correlation of second virial coefficients and solubilities useful in protein crystal growth. **Journal of Crystal Growth**, v. 196, n. 2-4, p. 424–433, 1999.

HAAS, C.; DRENTH, J.; WILSON, W. W. Relation between the Solubility of Proteins in Aqueous Solutions and the Second Virial Coefficient of the Solution. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 14, p. 2808–2811, 1999.

HAUROWITZ, F. **The Chemistry and Function of Proteins**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1963.

HUANG, B. X.; KIM, H.-Y.; DASS, C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 1237–47, 2004.

HUANG, H.-M.; CHEN, W.-Y.; RUAAN, R.-C. Microcalorimetric studies of the mechanism of interaction between designed peptides and hydrophobic adsorbents. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, n. 1, p. 23–28, 2003.

HUANG, S.-L.; LIN, F.-Y.; YANG, C.-P. Microcalorimetric studies of the effects on the interactions of human recombinant interferon- α 2a. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 545–552, 2005.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011.

JHA, N. S.; KISHORE, N. Thermodynamic studies on the interaction of folic acid with bovine serum albumin. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 43, n. 5, p. 814–821, 2011.

KABIRI, M.; UNSWORTH, L. D. Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: Peptide self-assembly and protein adsorption case studies. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 10, p. 3463–3473, 2014.

KELLEY, D. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 73–85, 2003.

LI, N.; ZHANG, S.; ZHENG, L.; GAO, Y.; YU, L. Second Virial Coefficient of bmimBF₄ / Triton X-100 / Cyclohexane Ionic Liquid Microemulsion as Investigated by Microcalorimetry. **Langmuir**, v. 24, n. 18, p. 2973–2976, 2008.

LI, Y.; HUANG, Q. Influence of Protein Self-Association on Complex Coacervation with Polysaccharide: A Monte Carlo Study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, p. 2615–2624, 2013.

LIN, Y. M.; LIU, D. Z.; HAW, H. M.; TSENG, L. P. Measurement of the second virial coefficient of DPPC- and DPPG-liposomes by isothermal titration calorimetry. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 38, n. 2, p. 103–106, 2007.

LIU, D.-Z. Z.; CHEN, W.-Y. Y.; TASI, L.-M. M.; YANG, S.-P. P. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 172, n. 1-3, p. 57–67, 2000.

LIU, W.; BRATKO, D.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W. Effect of alcohols on aqueous lysozyme-lysozyme interactions from static light-scattering measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 107, p. 289–298, 2004.

LU, Y.; CHEN, D.; WANG, G.; YAN, C. Study of Interactions of Bovine Serum Albumin in Aqueous (NH₄)SO₄ Solution at 25 ° C by Osmotic Pressure Measurements. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 54, n. 7, p. 1975–1980, 2009.

MA, Y.; ACOSTA, D. M.; WHITNEY, J. R.; et al. Determination of the second virial coefficient of bovine serum albumin under varying pH and ionic strength by composition-gradient multi-angle static light scattering. **Journal of biological physics**, v. 41, n. 1, p. 85–97, 2015.

MCBRIDE, D. W.; RODGERS, V. G. J. Interpretation of negative second virial coefficients from non-attractive protein solution osmotic pressure data: An alternate perspective. **Biophysical Chemistry**, v. 184, p. 79–86, 2013.

MCCUE, J. T. Use and application of hydrophobic interaction chromatography for protein purification. **Methods in Enzymology**. 1st ed., v. 541, p.51–65, 2014.

MCMILLAN, W. G.; MAYER, J. E. The Statistical Thermodynamics of Multicomponent Systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 13, n. 1945, p. 276–305, 1945.

MEDEIROS, G. A. H. **Cristalização de insulina suína com dióxido de carbono como agente acidificante**, 2009. Universidade Estadual de Campinas.

MEDEIROS, G. A. H. **Determinação de diagramas de fases e do segundo coeficiente virial osmótico b₂₂ na cristalização de proteínas com sal volátil carbamato de amônio**, 2013. Universidade Estadual de Campinas.

MÖLLER, J.; SCHROER, M. A.; ERLKAMP, M.; et al. The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense protein solutions: From nonlinear pressure response to protein crystallization. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 11, p. 2641–2648, 2012.

MOON; ANDERSON, C. O.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. Osmotic pressures and second virial coefficients for aqueous saline solutions of lysozyme. **Fluid Phase Equilibria**, v. 168, n. 2, p. 229–239, 2000.

MOON; CURTIS, R. A; ANDERSON, C. O.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. Protein–Protein Interactions in Aqueous Ammonium Sulfate Solutions. Lysozyme and Bovine Serum Albumin (BSA). **Journal of Solution Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 699–717, 2000.

NARAYANAN, J.; LIU, X. Y. Protein interactions in undersaturated and supersaturated solutions: a study using light and x-ray scattering. **Biophysical journal**, v. 84, n. 1, p. 523–532, 2003.

NEAL, B. L.; ASTHAGIRI, D.; LENHOFF, A M. Molecular origins of osmotic second virial coefficients of proteins. **Biophysical journal**, v. 75, n. 5, p. 2469–2477, 1998.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002.

NICCOLI, M.; CASTRONUOVO, G. The conformational stability of ovalbumin and lysozyme in the aqueous solutions of various cosolvents. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1–8, 2015.

NÚÑEZ, S.; VENHORST, J.; KRUSE, C. G. Target – drug interactions : first principles and their application to drug discovery. **Drug discovery today**, v. 17, n. January, p. 10–22, 2012.

PARK, Y.; CHOI, G. Effects of pH, salt type, and ionic strength on the second virial coefficients of aqueous bovine serum albumin solutions. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 193–198, 2009.

POLLITT, M. J.; BUCKTON, G.; BROCCCHINI, S.; ALPAR, H. O. Calorimetric study of bovine serum albumin dilution and adsorption onto polystyrene particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, p. 333–338, 2005.

POZNAŃSKI, J.; WSZELAKA-RYLIK, M.; ZIELENKIEWICZ, W. Concentration dependencies of NaCl salting of lysozyme by calorimetric methods. **Thermochimica Acta**, v. 409, n. 629970, p. 25–32, 2004.

POZNAŃSKI, J.; WSZELAKA-RYLIK, M.; ZIELENKIEWICZ, W. HEW lysozyme salting by high-concentration NaCl solutions followed by titration calorimetry. **Biophysical Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 137–144, 2005.

PRAUZNITZ, J. M.; LICHTENTHALER, R. N.; AZEVEDO, E. G. **Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria**. 3rd ed. Upper Sadddle River: Prentice Hall, 1999.

PRESS, A.; KESTIN, J.; DORFMAN, J. R. A Course in Statistical Mechanics. **Nature**, v. 207, n. 4997, p. 565–565, 1965. New York: Academic Press.

PRICE, S. L. Roles of additives and precipitants in crustalization of calcium- and integrin-vrinfinf protein. **Crystal Growth & Design**, v. 5, p. 983, 2005.

RABBANI, G.; KHAN, M. J.; AHMAD, A.; MASKAT, M. Y.; KHAN, R. H. Effect of copper oxide nanoparticles on the conformation and activity of ??-galactosidase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 96–105, 2014.

RETAILLEAU, P.; RIÈS-KAUTT, M.; DUCRUIX, A. No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH. **Biophysical journal**, v. 73, n. 4, p. 2156–2163, 1997.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Proteínas. **Química de Alimentos**. 2^a ed., p.184, 2007. São Paulo: Blucher.

RIES-KAUTT, M. M.; DUCRUIX, A. F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 2, p. 745, 1989.

ROSENBAUM, D. F.; ZUKOSKI, C. F. Protein interactions and crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v. 169, p. 752–758, 1996.

RYU, B. H.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Crystallization of hen egg white lysozyme by solvent freeze-out: Effect of cooling rate on protein inclusion in the ice layer. **Chemical**

Engineering and Technology, v. 33, n. 10, p. 1695–1698, 2010.

SCOPES, R. K. **Protein purification: Principles and practice**. 2nd ed. New York: Springer Verlag, 1988.

SEMENOVA, M.; DICKINSON, E. **Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions**. Boston: Brill, 2010.

SHAW, M. Interpretation of osmotic pressure in solutions of one and two nondiffusible components. **Biophysical journal**, v. 16, n. 1, p. 43–57, 1976. Elsevier.

SIGMA-ALDRICH INC. Albumin from bovine serum. .

SIGMA-ALDRICH INC. Lysozyme from chicken egg white. .

SILBERBERG, M. S. **Principles of General Chemistry**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2009.

SMITH, J. G. **Organic Chemistry**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 2009.

SMITH, J. M.; NESS, H. C. VAN; ABBOTT, M. M. **Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics**. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. 2012.

SONNTAG, R. E.; BORGNAKKE, C.; WYLEN, G. J. VAN. **Fundamentals of thermodynamics**. 2009.

SU, R.; QI, W.; HE, Z.; ZHANG, Y.; JIN, F. Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 6, p. 995–1005, 2008.

TESSIER, P. M.; LENHOFF, A. M. Measurements of protein self-association as a guide to crystallization. **Current Opinion in Biotechnology**, 2003.

TESSIER, P. M.; LENHOFF, A. M.; SANDLER, S. I.; et al. Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography. **Biophysical journal**, v. 82, n. 3, p. 1620–31, 2002.

TITCHENER-HOOKER, N. J.; DUNNILL, P.; HOARE, M. Micro biochemical engineering to accelerate the design of industrial-scale downstream processes for biopharmaceutical proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 473–487, 2008.

VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; LEAVITT, S. A.; FREIRE, E. Characterization of Protein–Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. **Methods in Molecular Biology**. v. 261, p.35–54, 2004.

VELEV, O. D.; KALER, E. W.; LENHOFF, A. M. Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. **Biophysical journal**, v. 75, n. January, p. 2682–2697, 1998.

VIDAL, J. **Thermodynamics: Applications in chemical engineering and the petroleum industry**. Paris: Editions Technip, 2003.

- VILKER, V. L.; COLTON, C. K.; SMITH, K. A. The osmotic pressure of concentrated protein solutions: Effect of concentration and ph in saline solutions of bovine serum albumin. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 79, n. 2, p. 548–566, 1981.
- WILLS, P. R.; WINZOR, D. J. Direct allowance for the effects of thermodynamic nonideality in the quantitative characterization of protein self-association by osmometry. **Biophysical Chemistry**, v. 145, n. 2-3, p. 64–71, 2009.
- WILSON, W. W.; DELUCAS, L. J. Applications of the second virial coefficient: protein crystallization and solubility. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications**, v. 70, p. 543–54, 2014.
- WU, J.; PRAUSNITZ, J. M. Osmotic pressures of aqueous bovine serum albumin solutions at high ionic strength. **Fluid Phase Equilibria**, v. 155, p. 139–154, 1999.
- YADAV, S.; SHIRE, S. J.; KALONIA, D. S. Viscosity analysis of high concentration bovine serum albumin aqueous solutions. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 1973–1983, 2011.
- YAMPOLSKAYA, G.; PLATIKANOV, D. Proteins at fluid interfaces : Adsorption layers and thin liquid films. , v. 130, n. 2006, p. 159–183, 2007.
- YANG, B.; HAO, F.; LI, J.; et al. Characterization of the binding of chrysoidine, an illegal food additive to bovine serum albumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 227–232, 2014.
- YOUSEF, M. A.; DATTA, R.; RODGERS, V. G. J. Understanding Nonidealities of the Osmotic Pressure of Concentrated Bovine Serum Albumin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 207, n. 2, p. 273–282, 1998.
- ZHANG, F.; ROOSEN-RUNGE, F.; SKODA, M. W. A.; et al. Hydration and interactions in protein solutions containing concentrated electrolytes studied by small-angle scattering. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 7, p. 2483–2493, 2012.
- ZHANG, J. Protein-Protein Interactions in Salt Solutions. **Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools**. p.359–376, 2012.
- ZHENG, P.; MA, Y.; PENG, X.; et al. Determination of the Interaction Enthalpy between Microemulsion Droplets by Isothermal Titration Microcalorimetry. **Langmuir**, v. 27, n. 20, p. 12280–12283, 2011.
- ZHU, C.; STRENG, W. H. Investigation of drug self-association in aqueous solution using calorimetry , conductivity , and osmometry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 130, p. 159–168, 1996.
- ZIMM, B. H. Application of the Methods of Molecular Distribution to Solutions of Large Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 14, n. May 2015, p. 164, 1946.
- ZYDNEY, A. L. Continuous Downstream Processing for High Value Biological Products : A Review. **Biotechnology and bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 465–475, 2016.

APÊNDICE 1

Os gráficos obtidos nos ensaios de calorimetria de titulação isotérmica são apresentados desta seção. Eles foram realizados de modo a obter o calor de diluição da amostra de proteína sobre a solução tampão com diferentes concentrações salinas. Todos os ensaios foram realizados a 25°C no equipamento iTC200 da MicroCal.

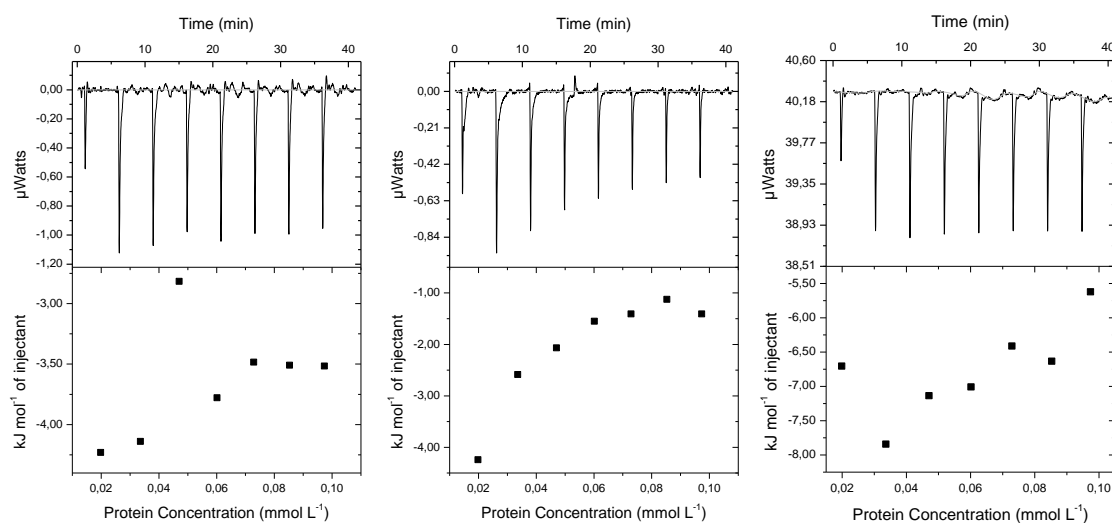


FIGURA A.1.1. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO A pH 4,6.

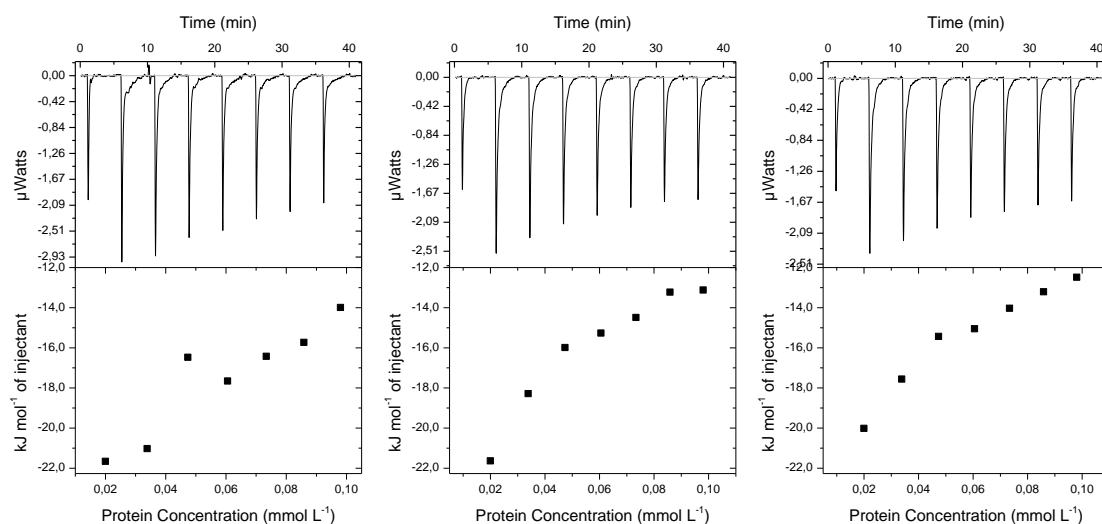


FIGURA A.1.2. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO 0,05 mol L⁻¹ NaCl A pH 4,6.

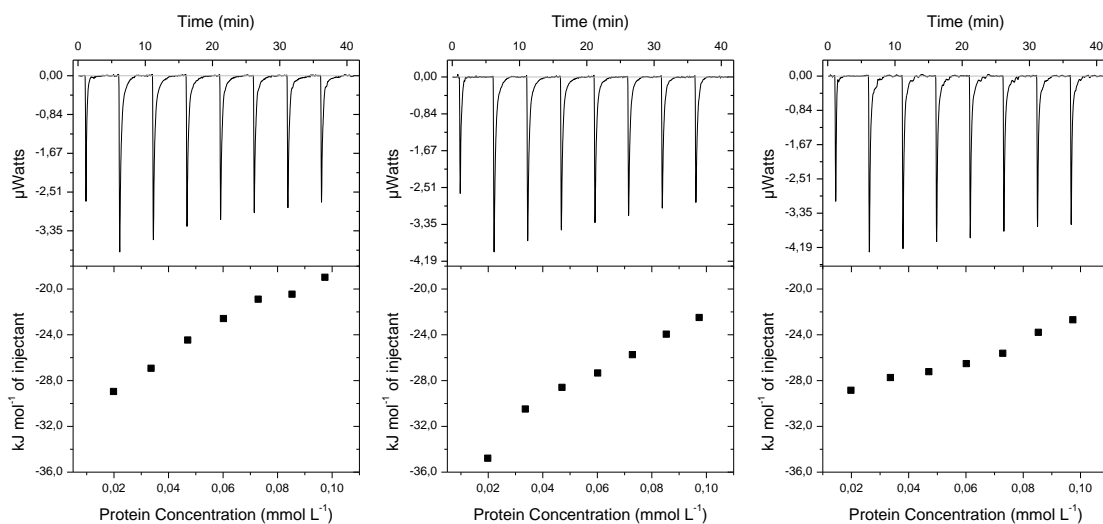


FIGURA A.1.3. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ DE NaCl A pH 4,6.

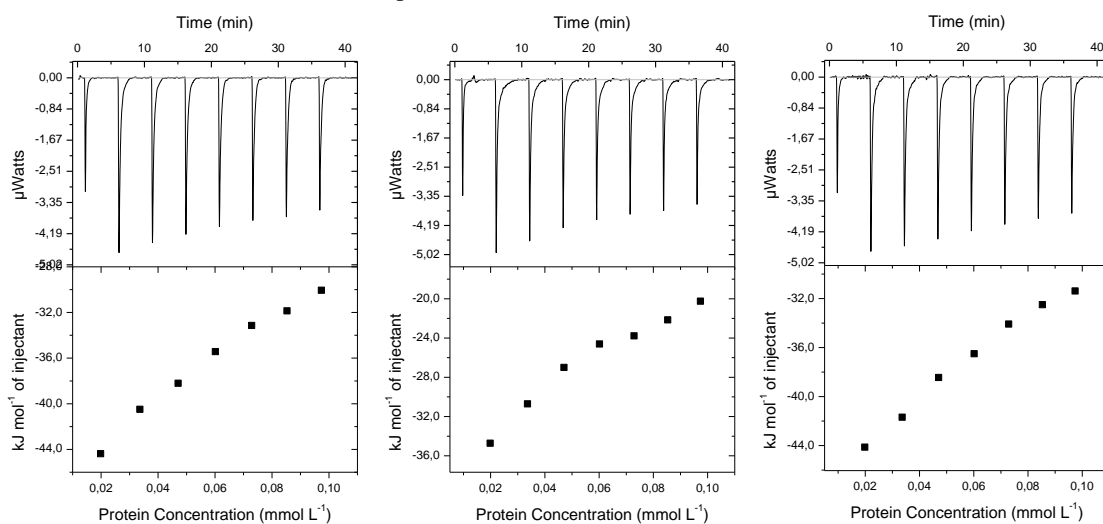


FIGURA A.1.4. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ DE NaCl A pH 4,6.

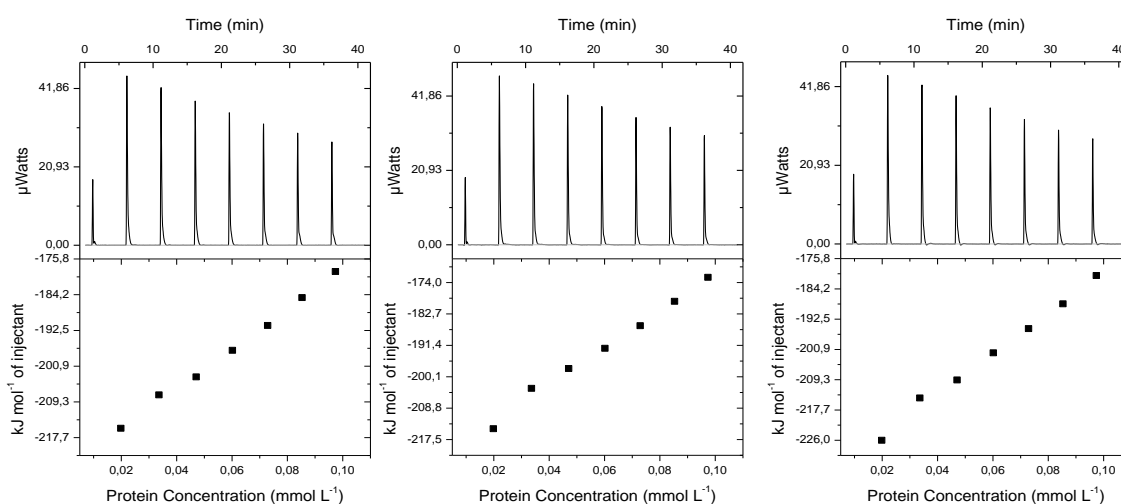


FIGURA A.1.5. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ DE NaCl A pH 4,6.

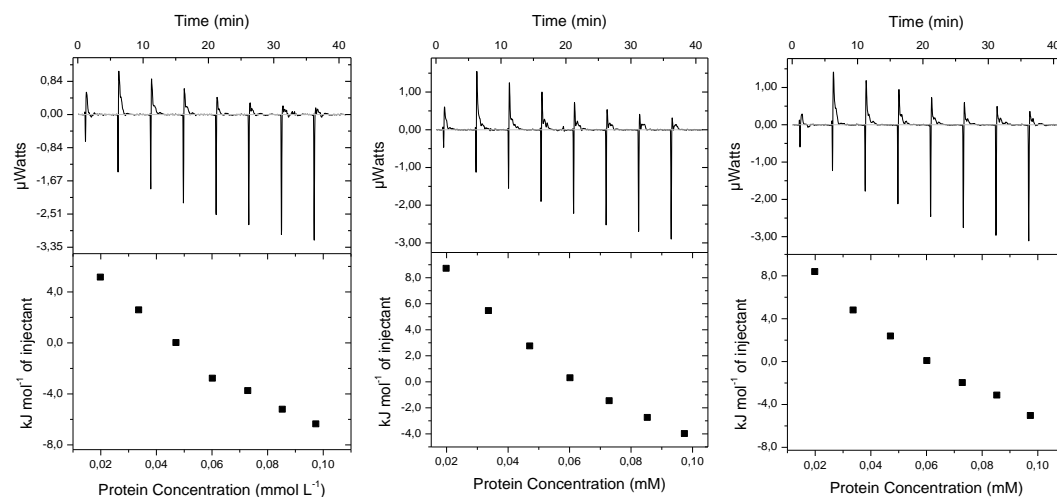


FIGURA A.1.6. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ DE (NH₄)₂SO₄ A pH 4,6.

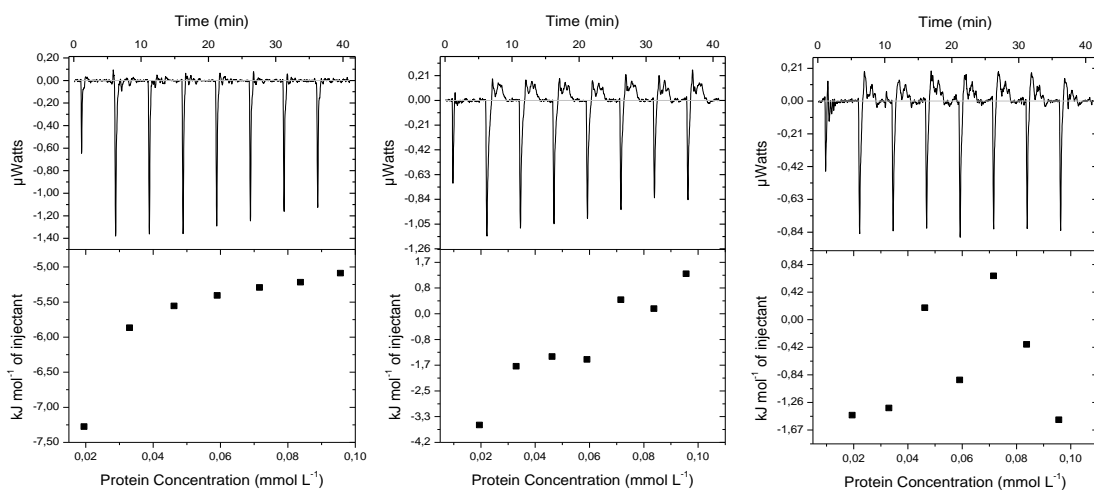


FIGURA A.1.7. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO A pH 5,4.

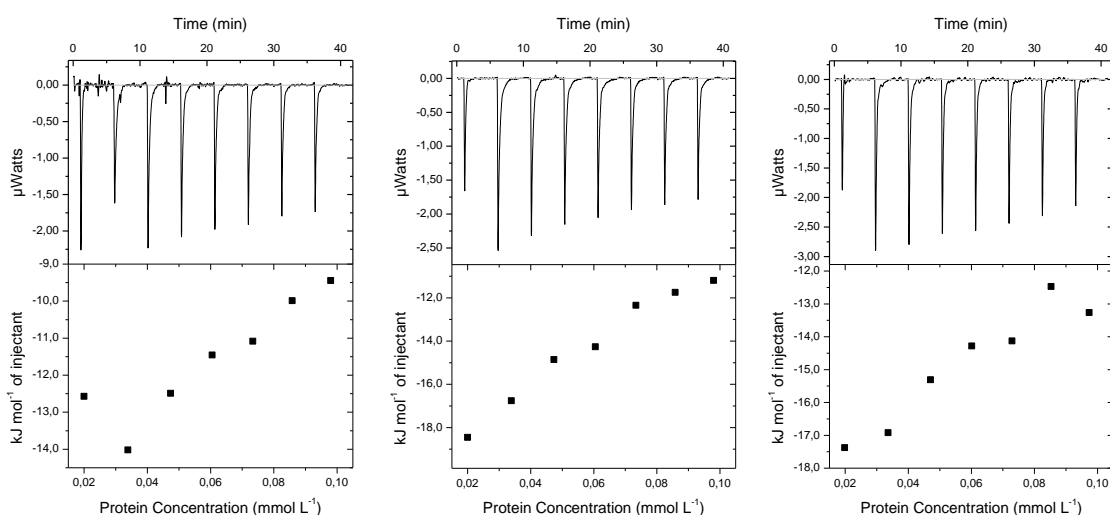


FIGURA A.1.8. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,05 mol L⁻¹ NaCl A pH 5,4.

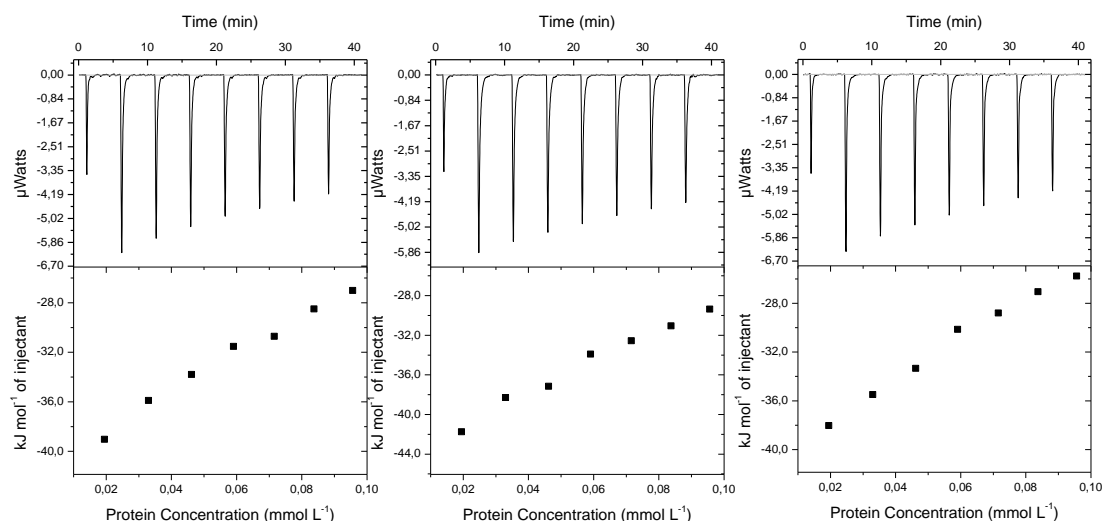


FIGURA A.1.9. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ NaCl A pH 5,4.

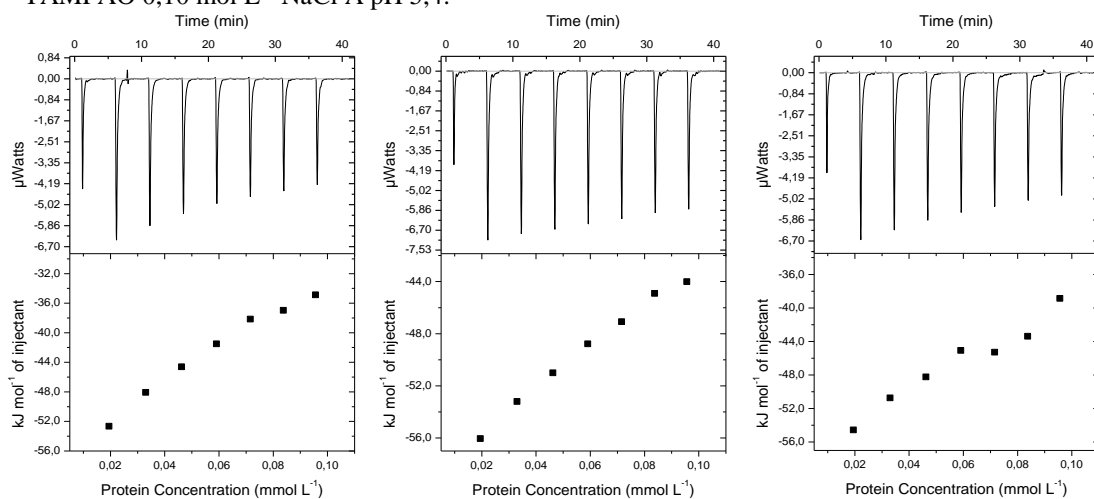


FIGURA A.1.10. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ NaCl A pH 5,4.

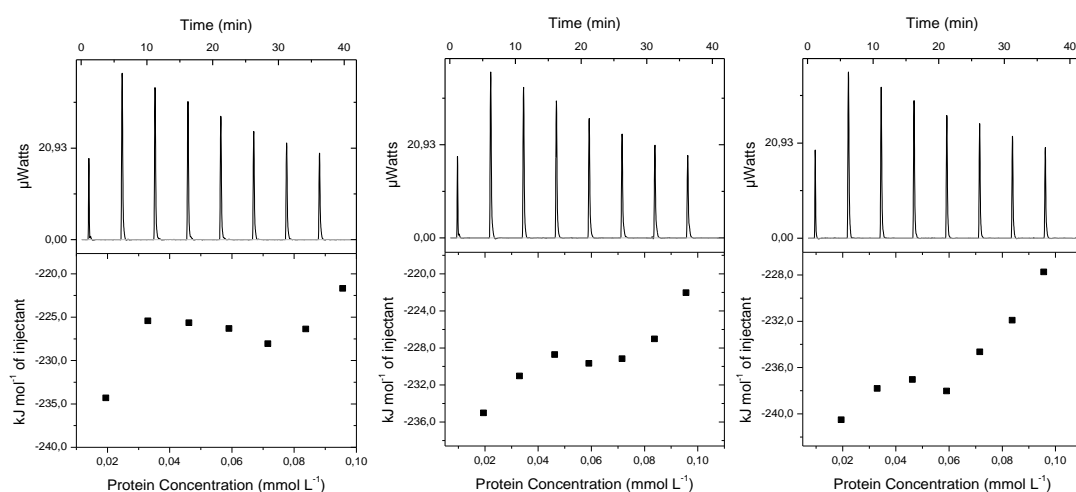


FIGURA A.1.11. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl A pH 5,4.

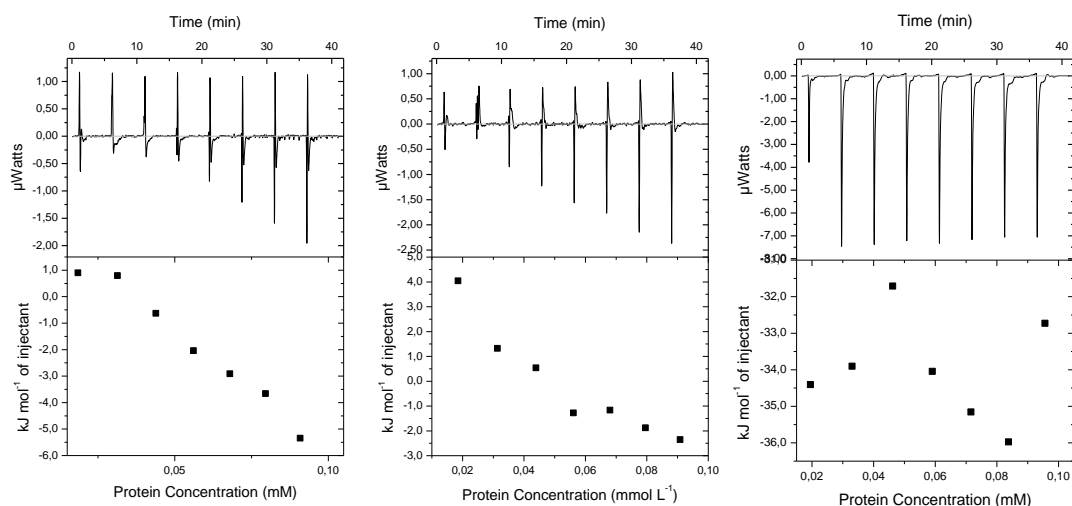


FIGURA A.1.12. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ A pH 5,4.

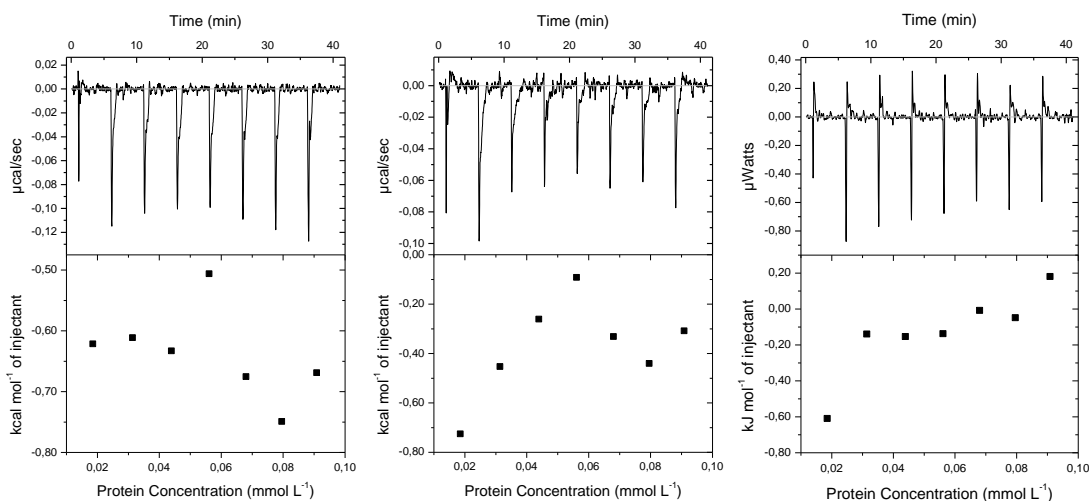


FIGURA A.1.13. CURVA DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO A pH 7,4.

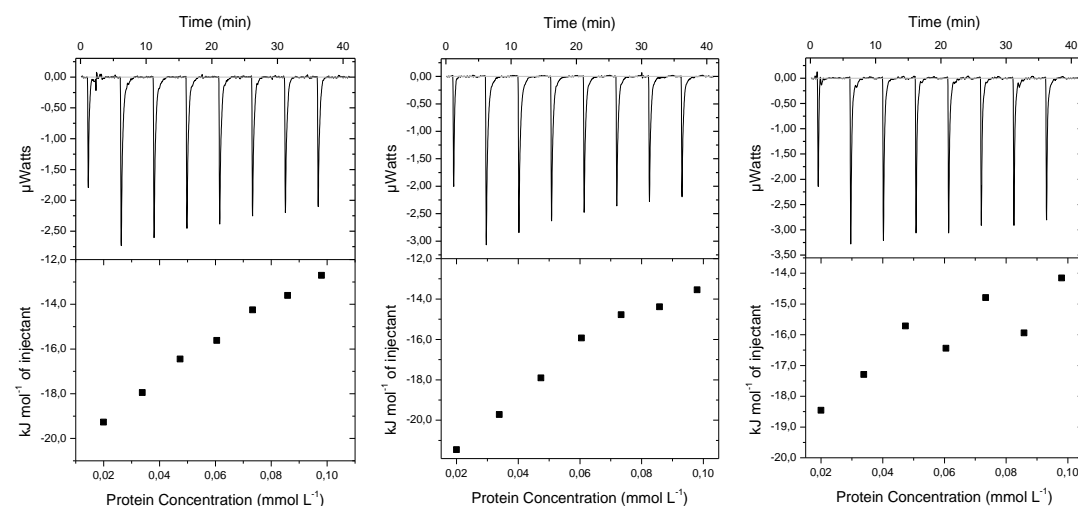


FIGURA A.1.14. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO 0,05 mol L⁻¹ NaCl A pH 7,4.

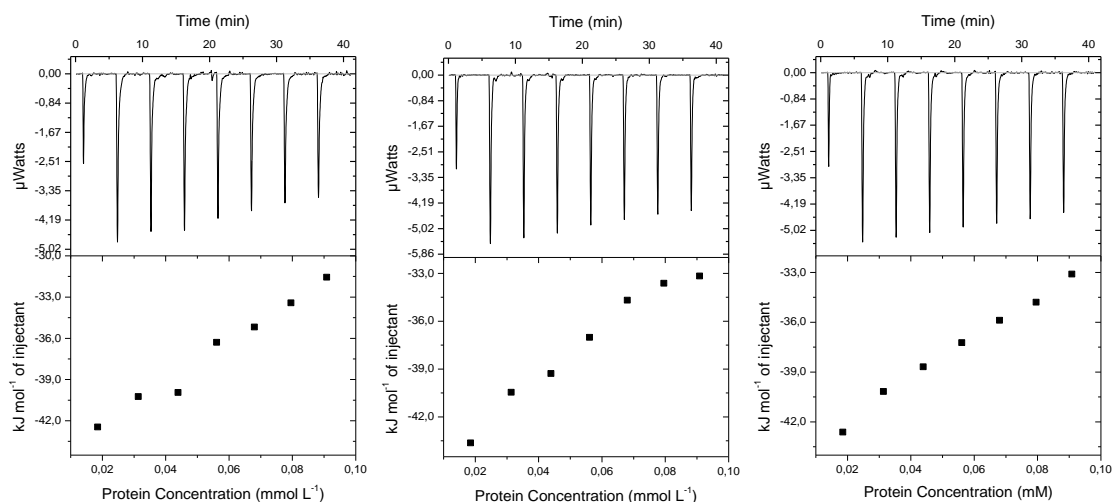


FIGURA A.1.15. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ DE NaCl A pH 7,4.

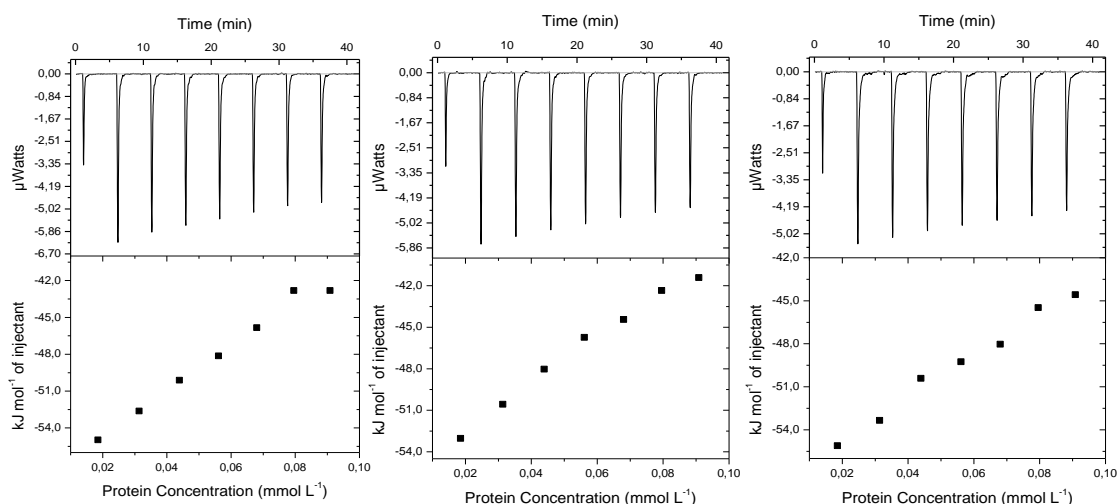


FIGURA A.1.16. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO 0,15 mol L⁻¹ NaCl A pH 7,4.

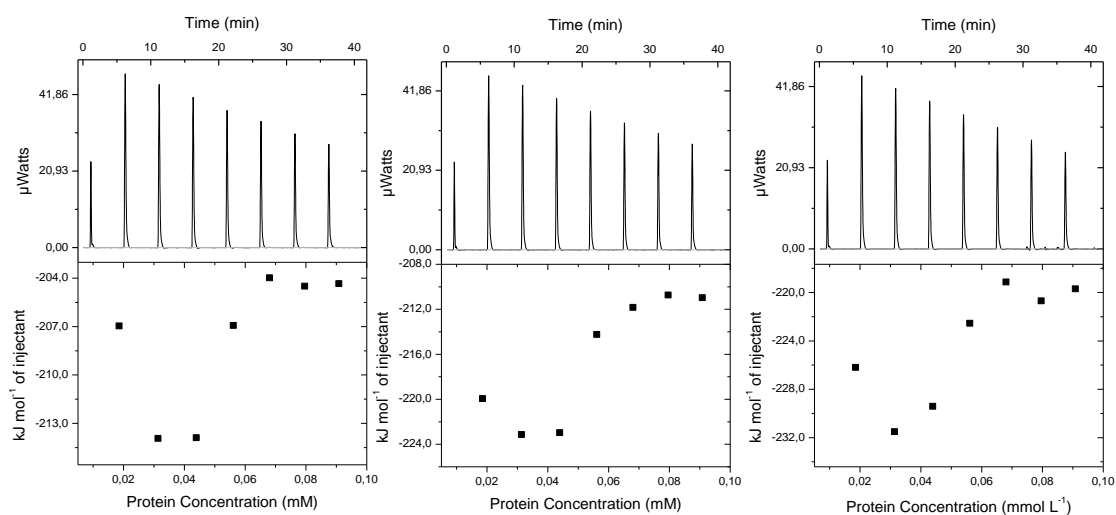


FIGURA A.1.17. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl A pH 7,4.

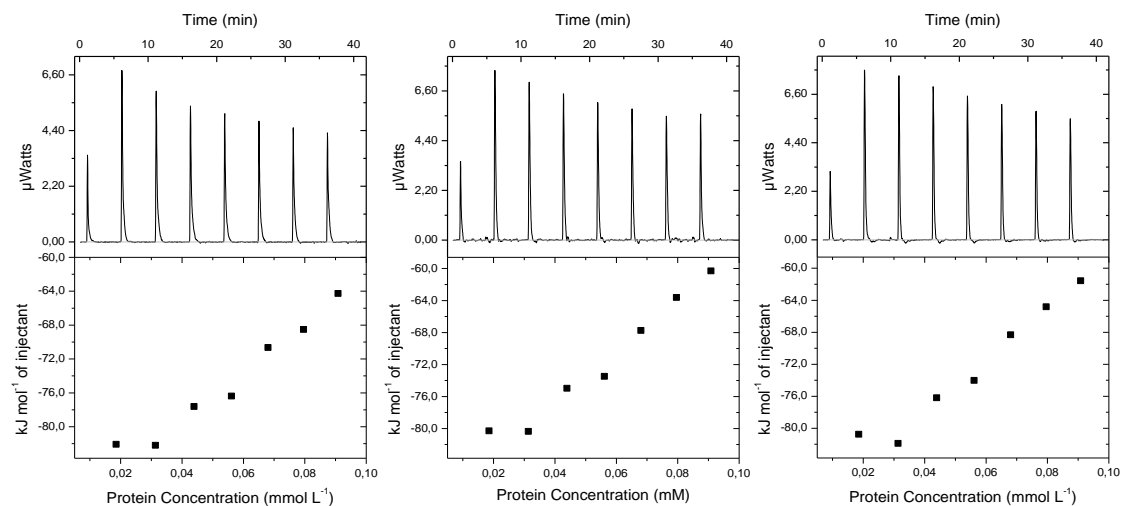


FIGURA A.1.18. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE BSA TITULADA SOBRE SOLUÇÃO 0,15 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ A pH 7,4

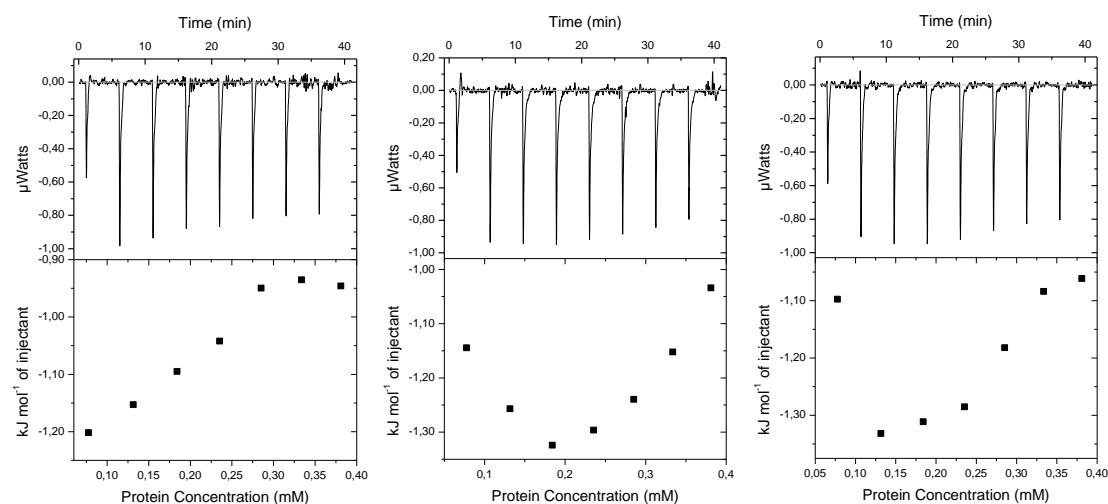


FIGURA A.1.19. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO A pH 4,6.

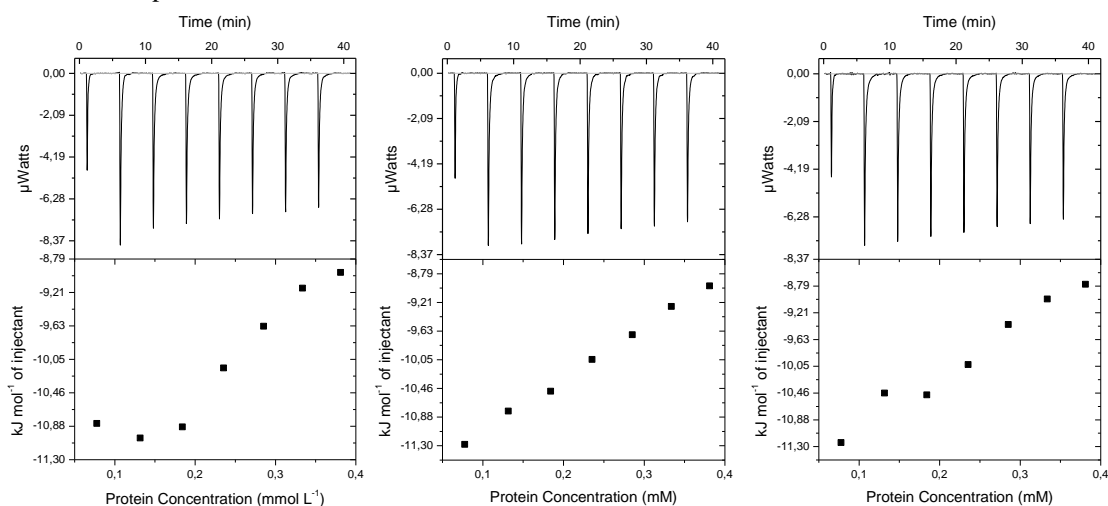


FIGURA A.1.20. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ NaCl A pH 4,6

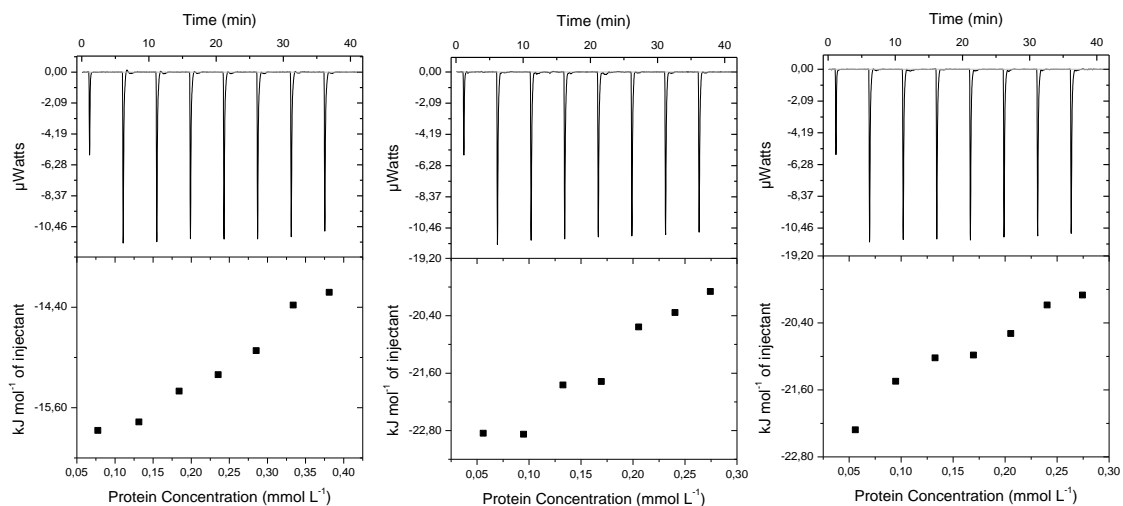


FIGURA A.1.21. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,20 mol L⁻¹ NaCl A pH 4,6.

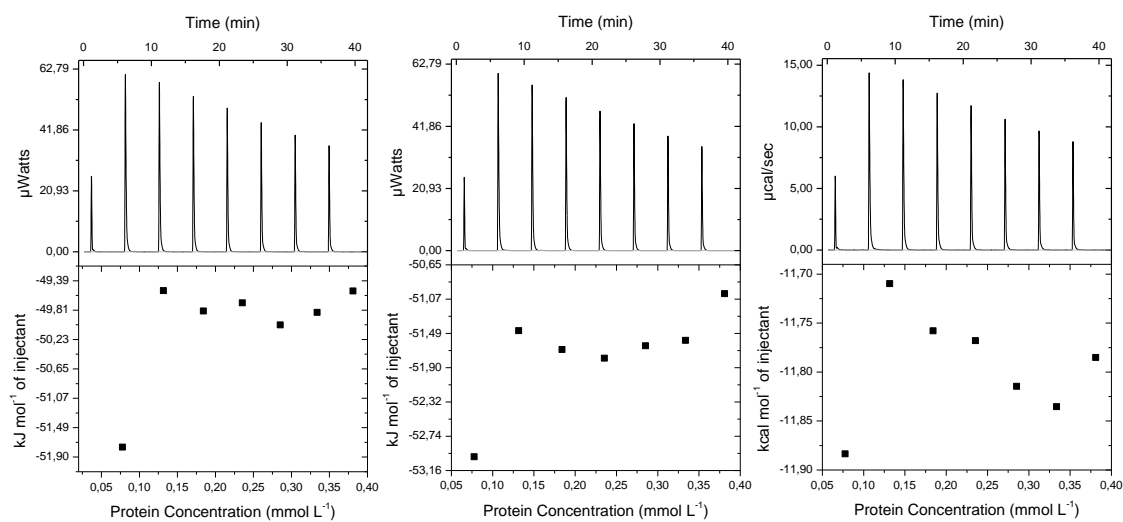


FIGURA A.1.22 CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl A pH 4,6.

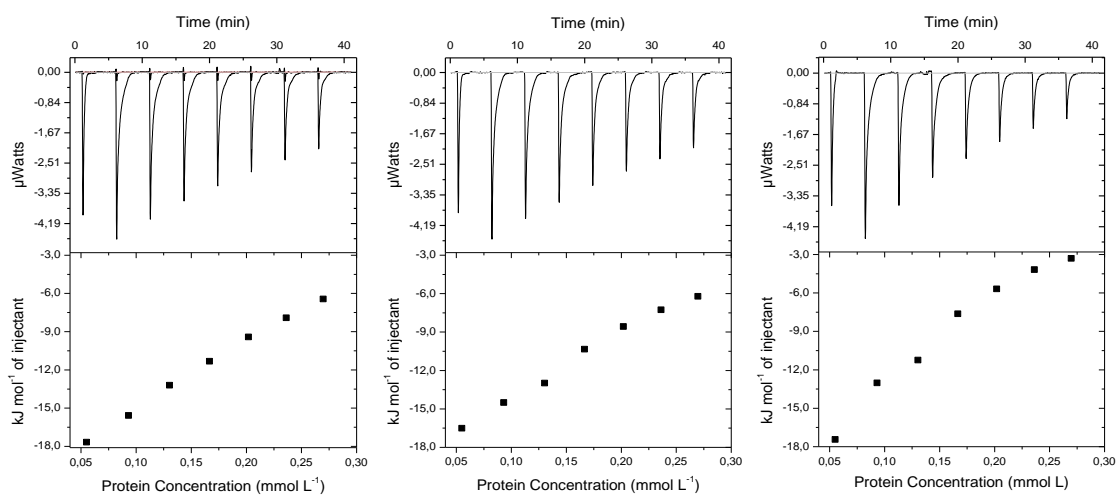


FIGURA A.1.23. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO A pH 7,0.

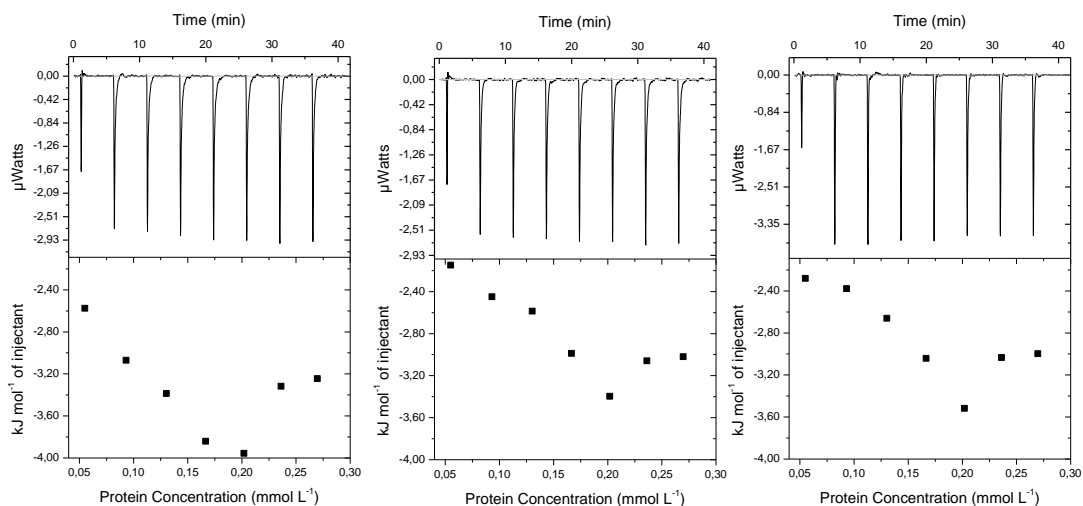


FIGURA A.1.24. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ NaCl A pH 7,0.

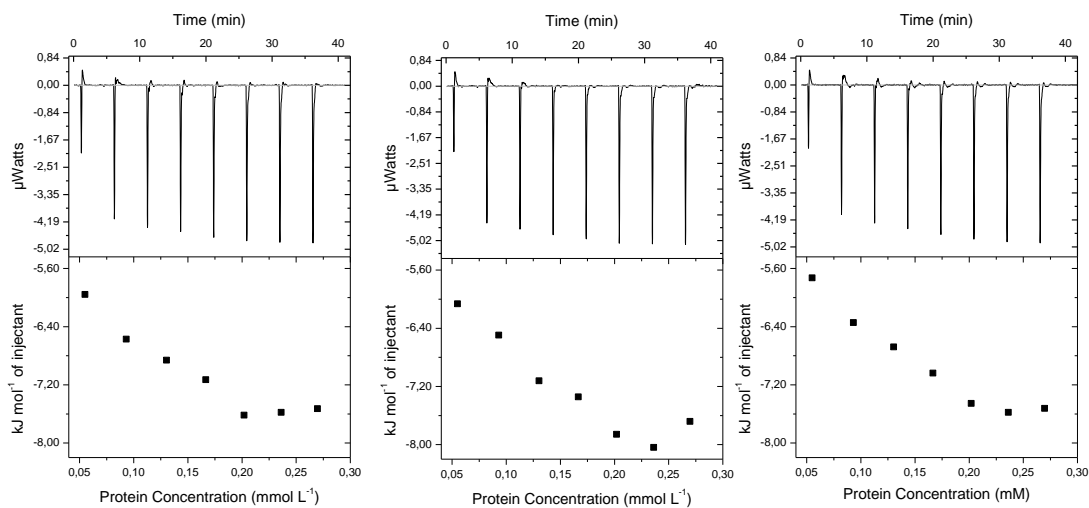


FIGURA A.1.25. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,20 mol L⁻¹ NaCl A pH 7,0.

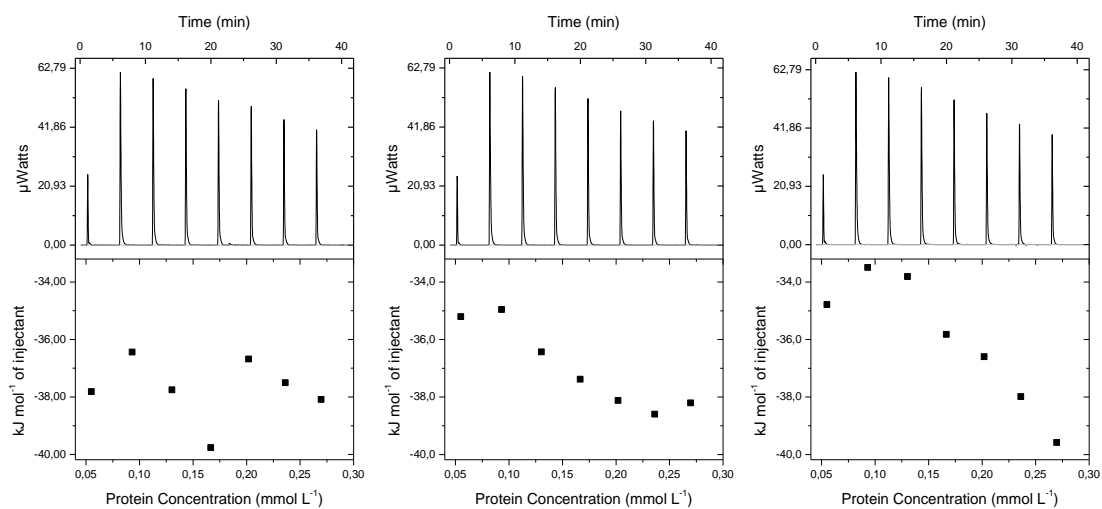


FIGURA A.1.26. CURVAS DE ITC PARA SOLUÇÃO DE HEWL TITULADA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl A pH 7,0.

APÊNDICE 2

Nesta seção constam as curvas de referência (branco) para cada condição avaliada no ITC. Nos dados brutos (parte superior dos gráficos) é plotada a taxa de energia por injeção em função do tempo, enquanto nos dados tratados (parte inferior) é plotada a variação de calor molar por injeção em função da concentração de proteína correspondente à amostra da qual esta curva será subtraída, de acordo com as recomendações do desenvolvedor do software Origin®.

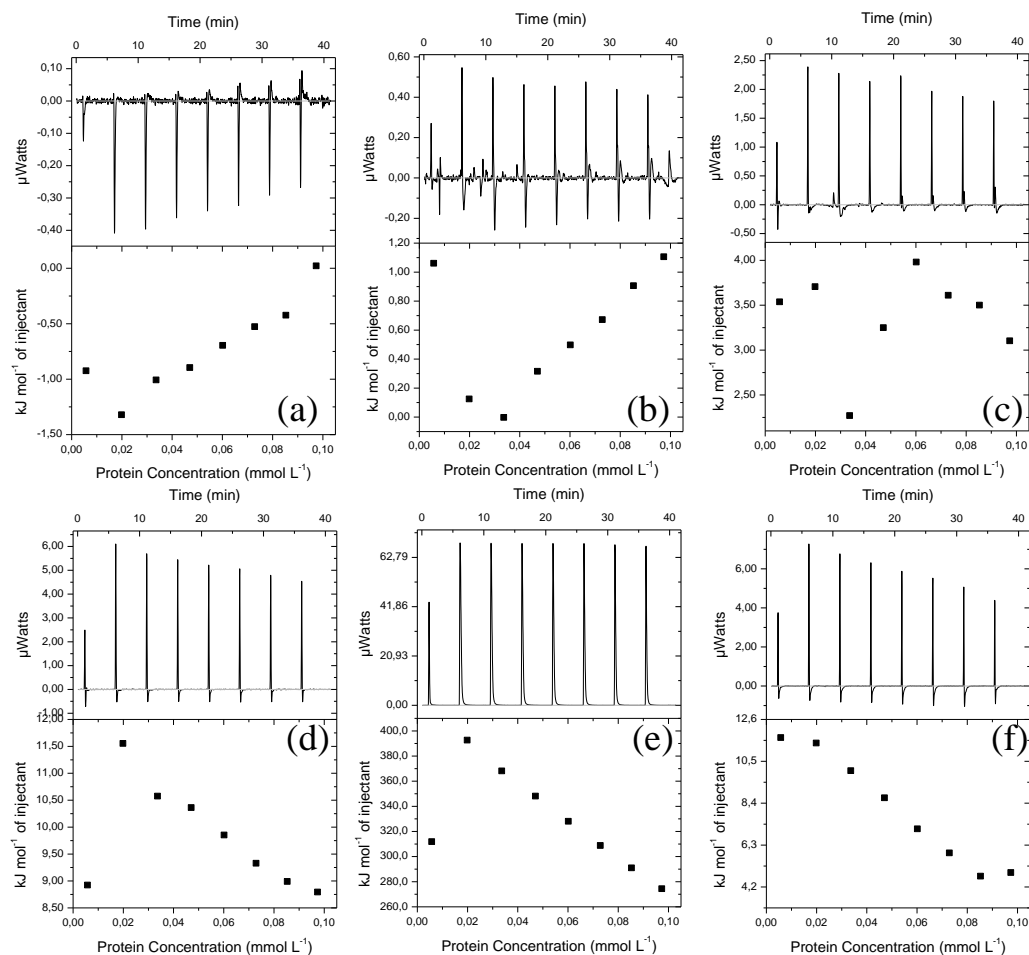


FIGURA A.2.1. CURVAS DE REFERÊNCIA PARA BSA A pH 4,6 E 25°C, PARA (a) TAMPÃO, (b) 0,05 mol L⁻¹ NaCl, (c) 0,10 mol L⁻¹ NaCl, (d) 0,15 mol L⁻¹ NaCl, (e) 0,50 mol L⁻¹ NaCl E (f) 0,15 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄.

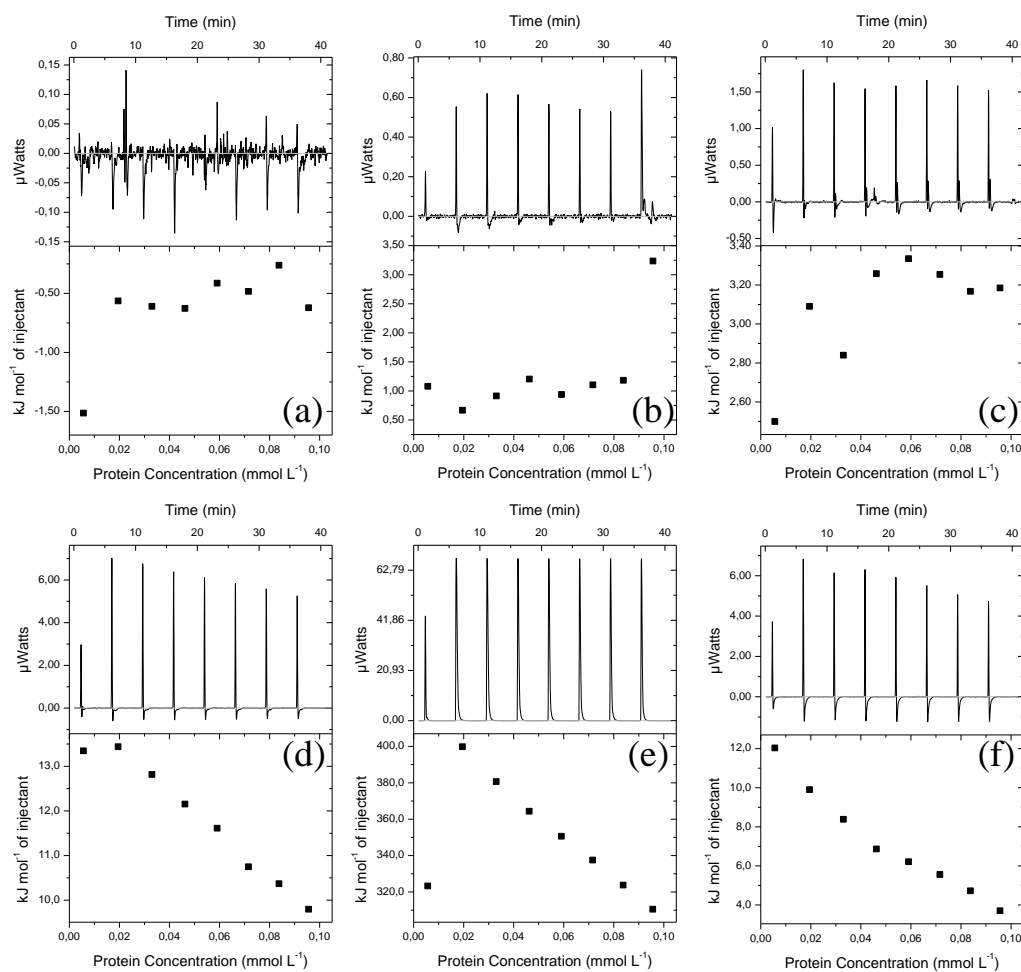


FIGURA A.2.2. CURVAS DE REFERÊNCIA PARA BSA A pH 5,4 E 25°C, PARA (a) TAMPÃO, (b) 0,05 mol L⁻¹ NaCl, (c) 0,10 mol L⁻¹ NaCl, (d) 0,15 mol L⁻¹ NaCl, (e) 0,50 mol L⁻¹ NaCl E (f) 0,15 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄.

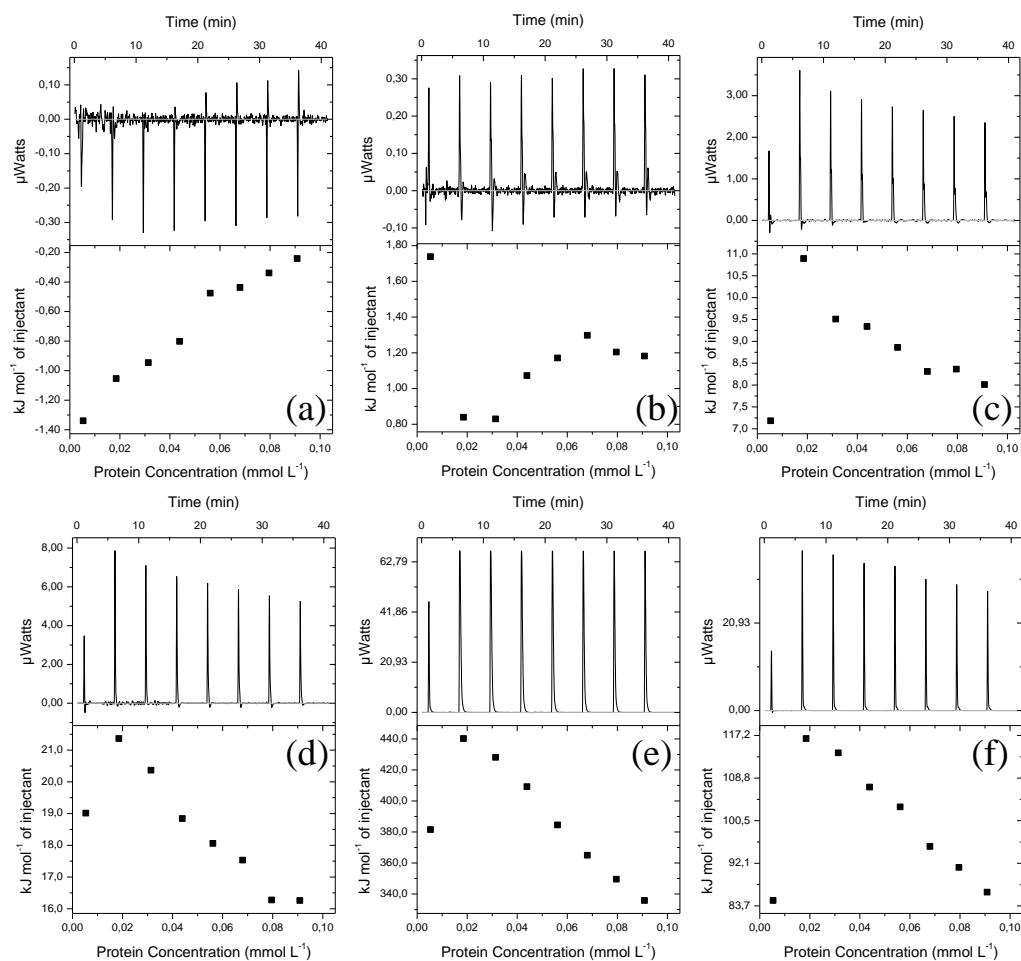


FIGURA A.2.3. CURVAS DE REFERÊNCIA PARA BSA A pH 7,4 E 25°C, PARA (a) TAMPÃO, (b) 0,05 mol L^{-1} NaCl, (c) 0,10 mol L^{-1} NaCl, (d) 0,15 mol L^{-1} NaCl, (e) 0,50 mol L^{-1} NaCl E (f) 0,15 mol L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

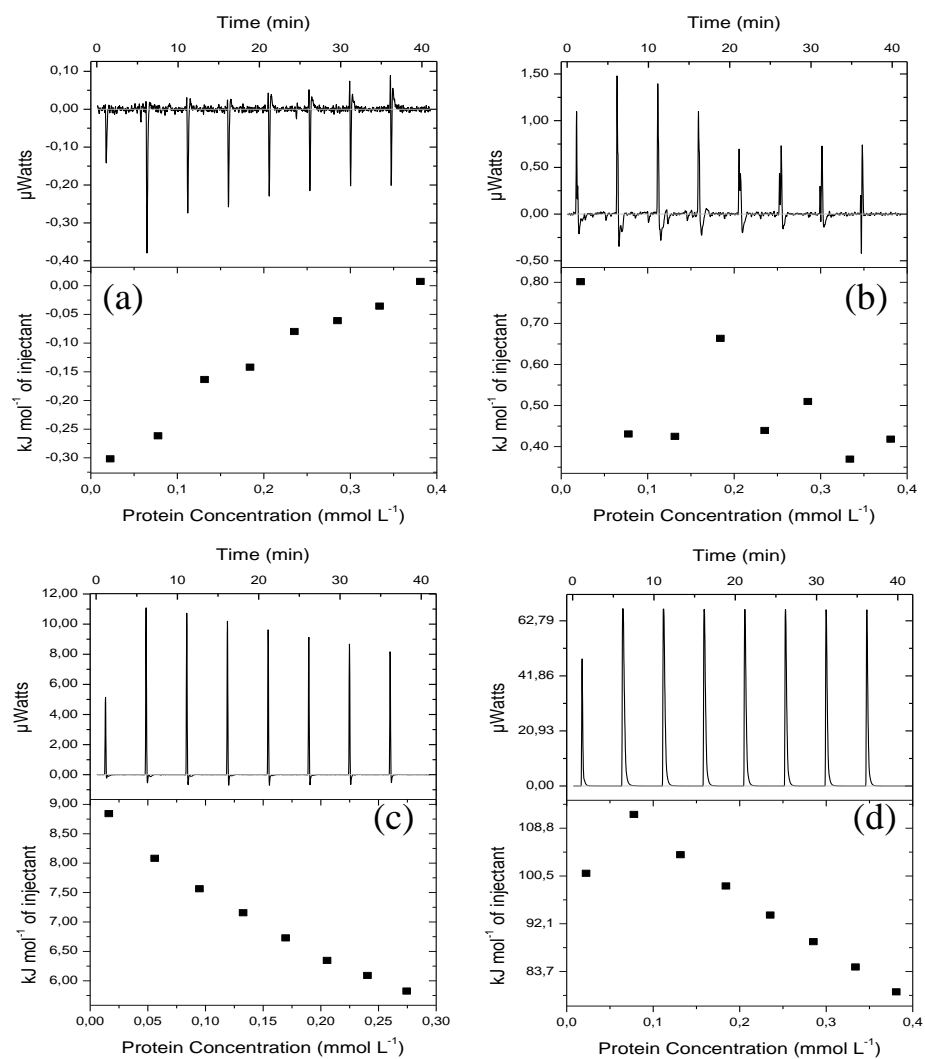


FIGURA A.2.4. CURVAS DE REFERÊNCIA PARA LISOZIMA A pH 4,6 E 25°C, PARA (a) TAMPÃO, (b) 0,10 mol L⁻¹ NaCl, (c) 0,20 mol L⁻¹ NaCl, (d) 0,50 mol L⁻¹ NaCl.

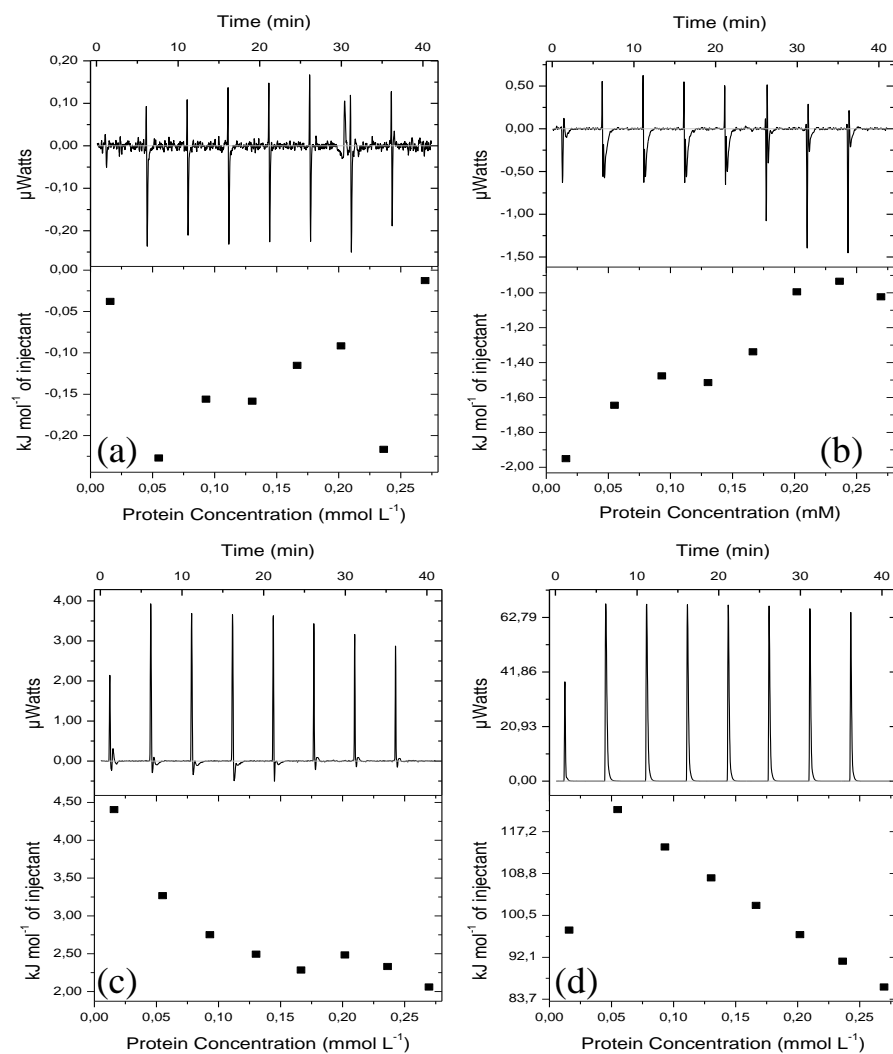


FIGURA A.2.5. CURVAS DE REFERÊNCIA PARA LISOZIMA A pH 7,0 E 25°C, PARA (a) TAMPÃO, (b) 0,10 mol L⁻¹ NaCl, (c) 0,20 mol L⁻¹ NaCl, (d) 0,50 mol L⁻¹ NaCl.

APÊNDICE 3

Apresentam-se aqui os gráficos cujo ajuste linear fornece o dado de b_2 para as condições estudadas.

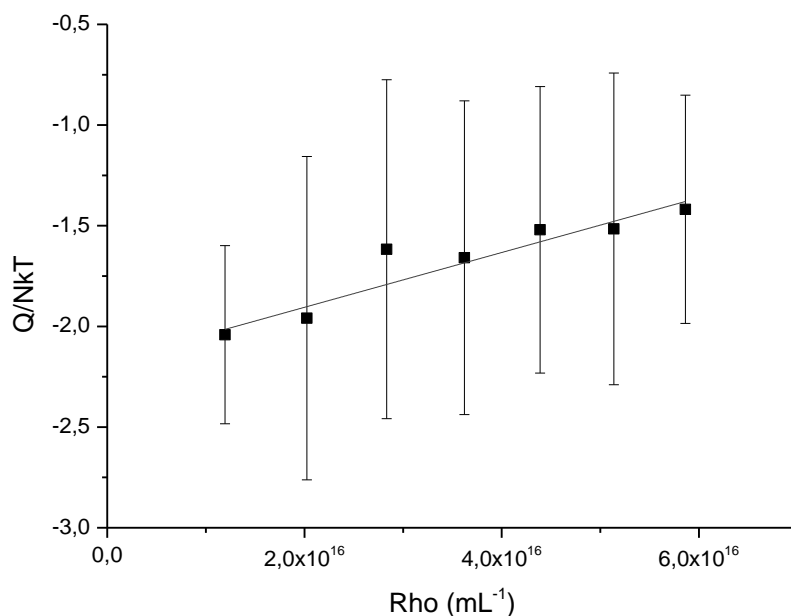


FIGURA A.3.1. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO EM pH 4,6.

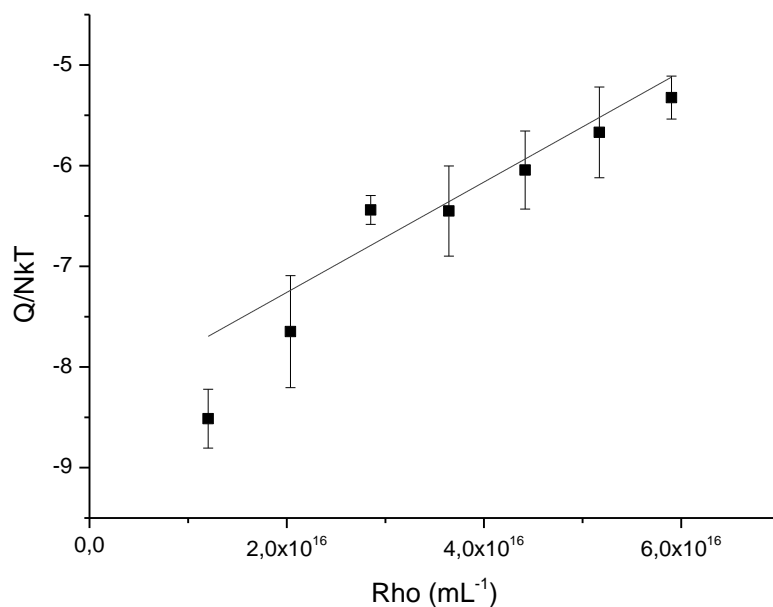


FIGURA A.3.2. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,05 mol L⁻¹ NaCl EM pH 4,6.

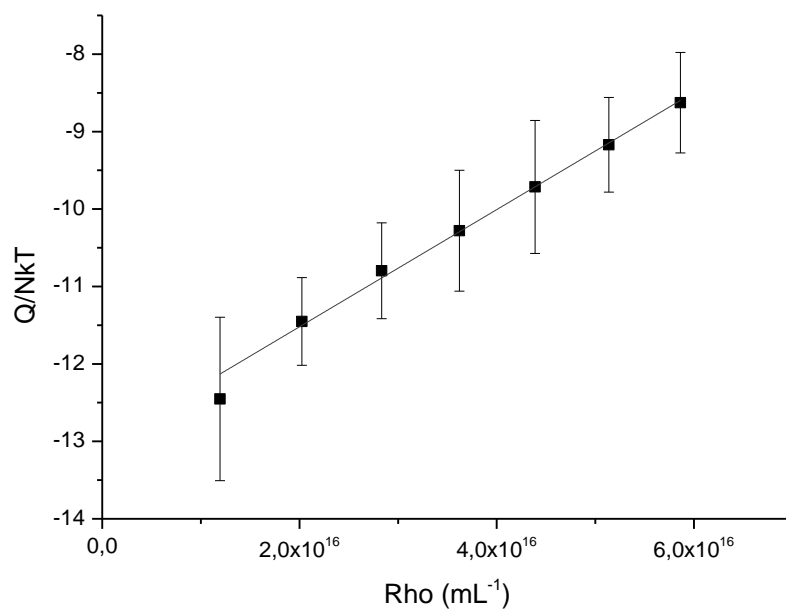


FIGURA A.3.3. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ NaCl EM pH 4,6.

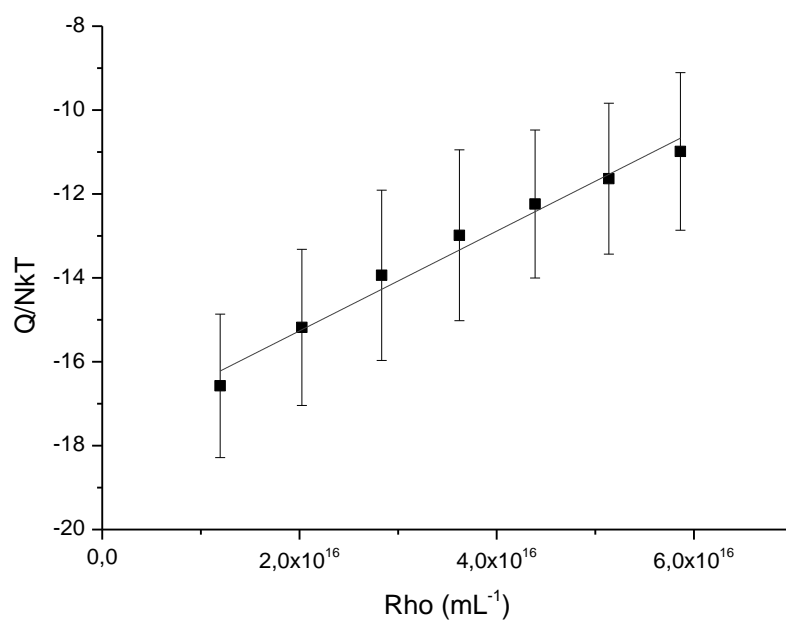


FIGURA A.3.4. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ NaCl EM pH 4,6.

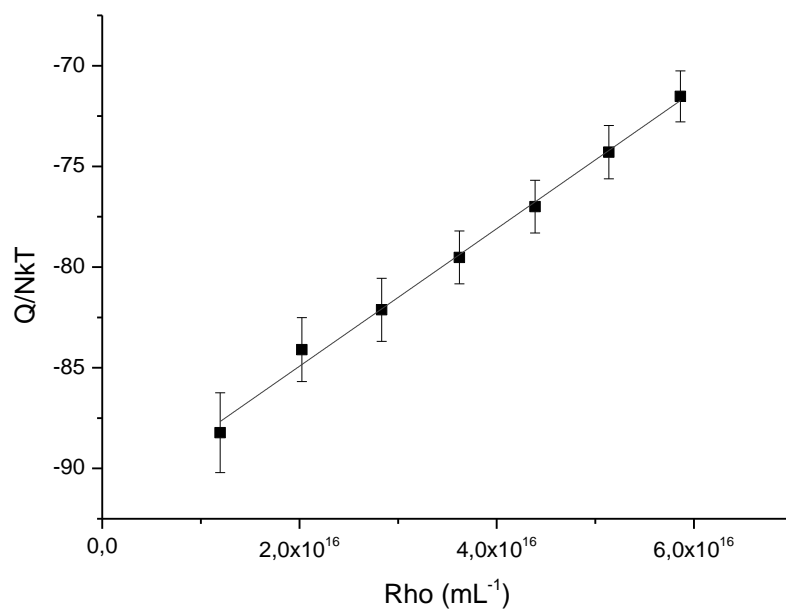


FIGURA A.3.5. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl EM pH 4,6.

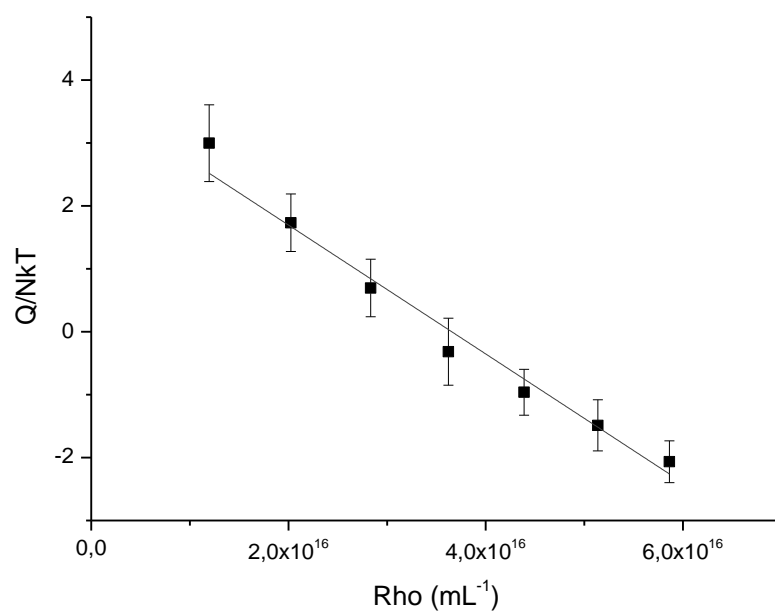


FIGURA A.3.6. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ EM pH 4,6.

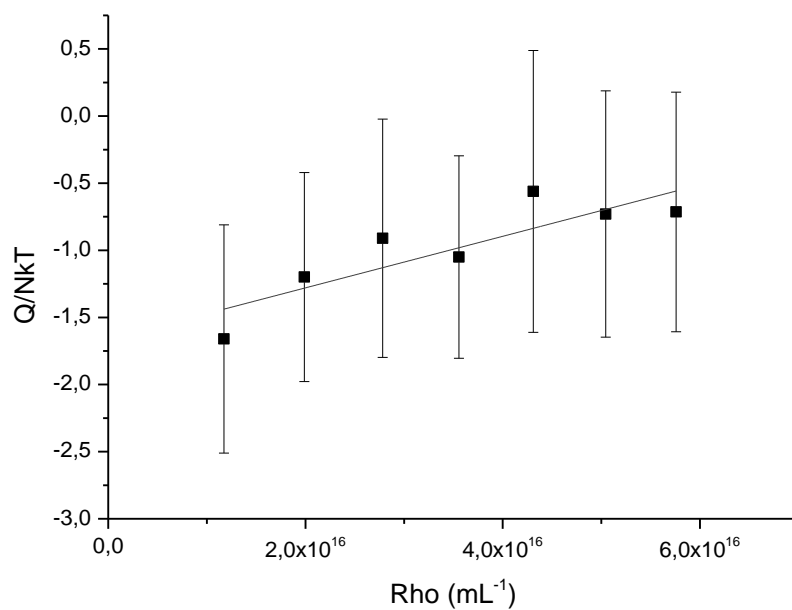


FIGURA A.3.7. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO EM pH 5,4.

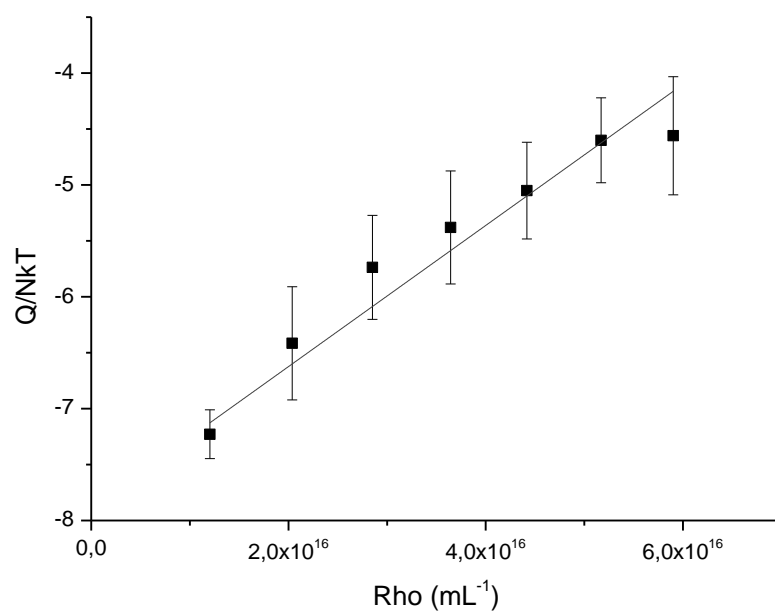


FIGURA A.3.8. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,05 mol L⁻¹ NaCl EM pH 5,4.

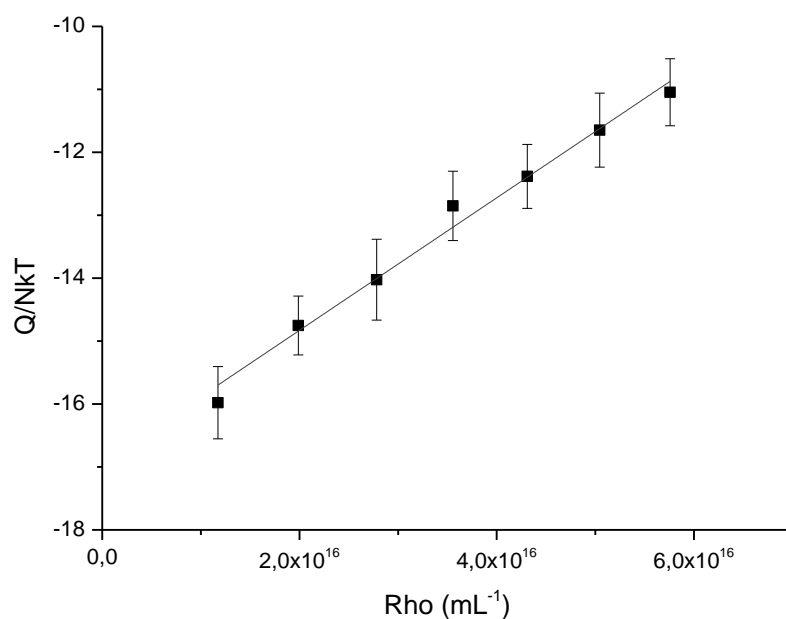


FIGURA A.3.9. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ NaCl EM pH 5,4.

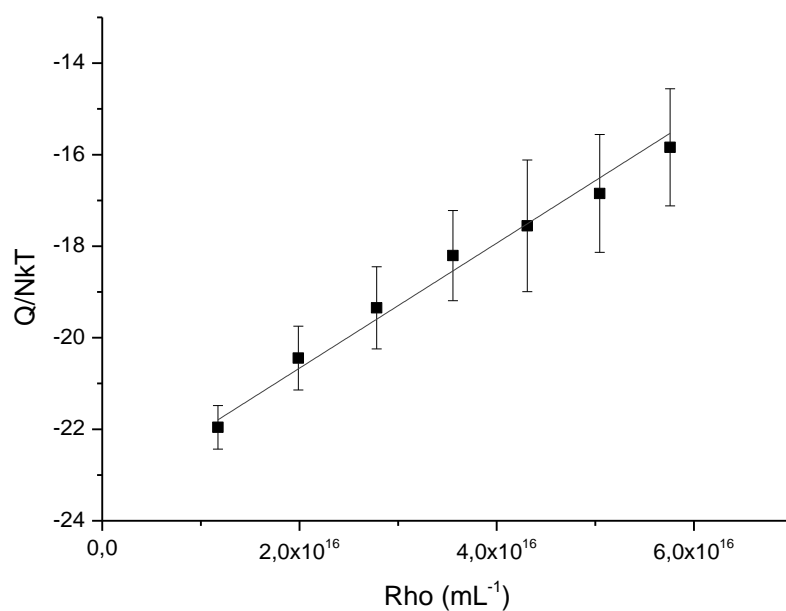


FIGURA A.3.10. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ NaCl EM pH 5,4.

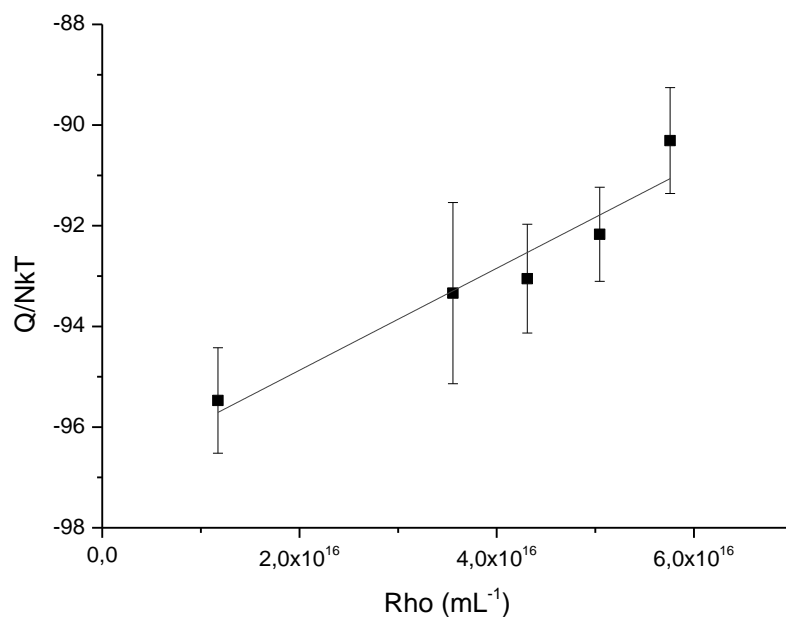


FIGURA A.3.11. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl EM pH 5,4.

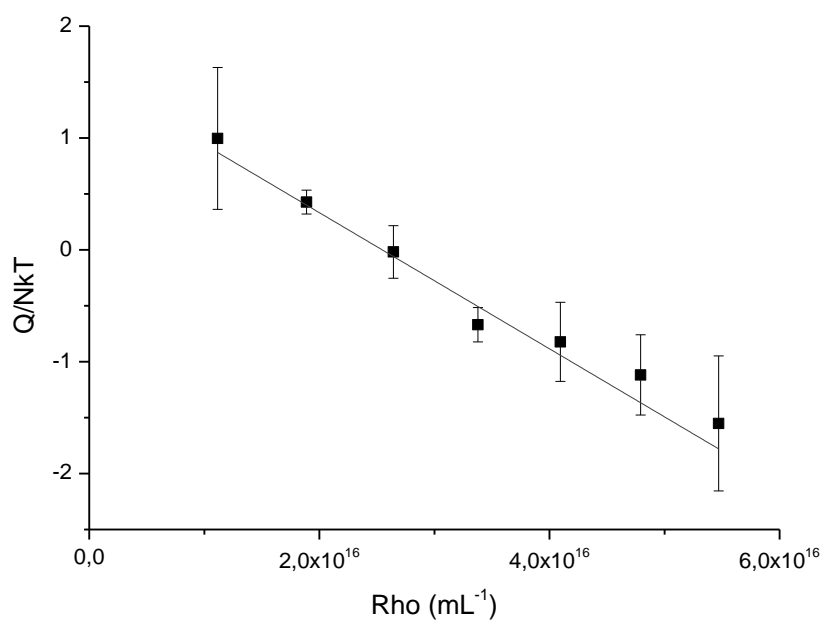


FIGURA A.3.12. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ EM pH 5,4.

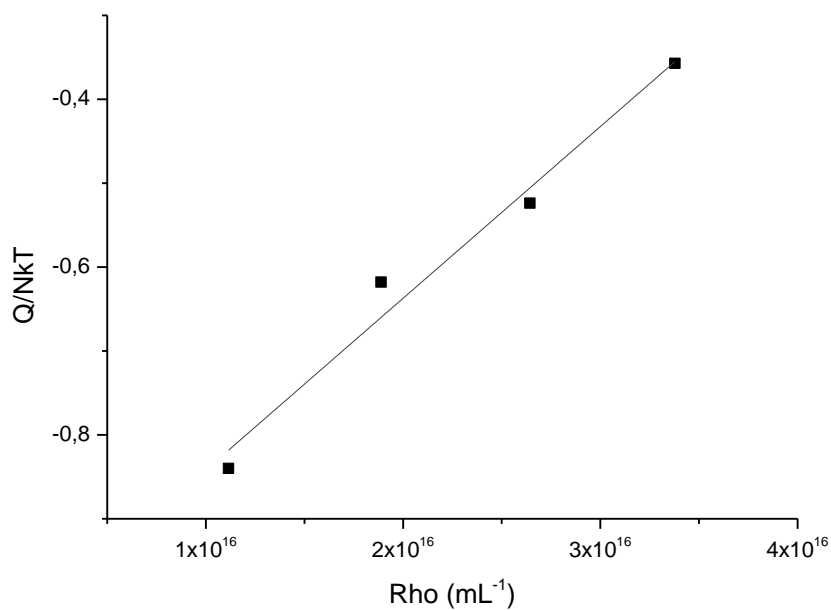


FIGURA A.3.13. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO EM pH 7,4.

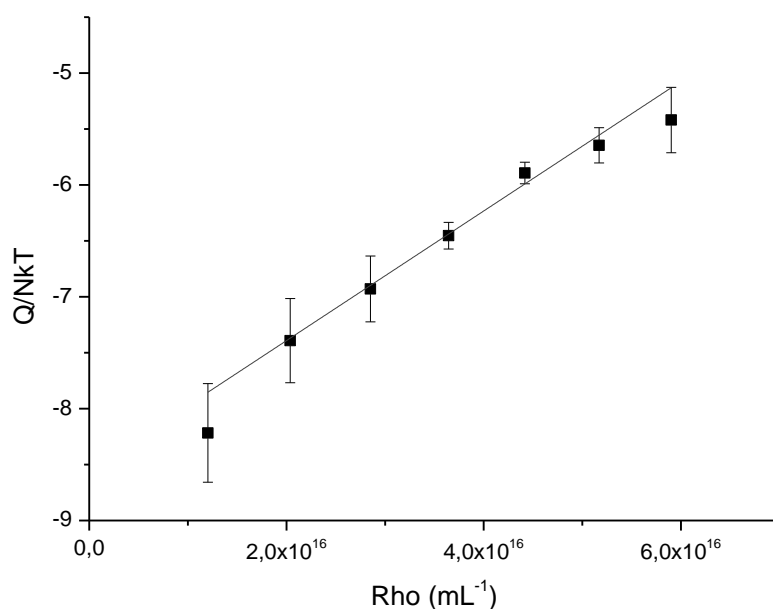


FIGURA A.3.14. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,05 mol L⁻¹ NaCl EM pH 7,4.

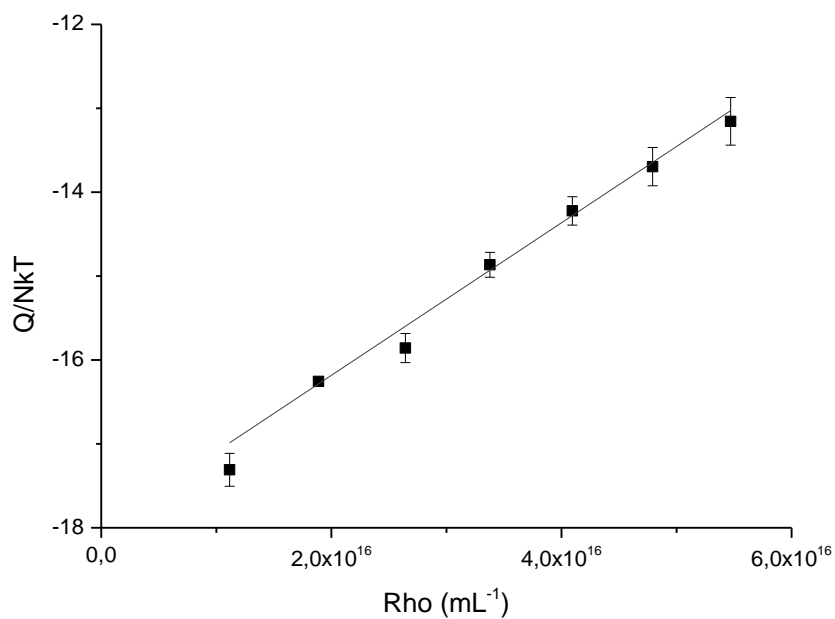


FIGURA A.3.15. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L⁻¹ NaCl EM pH 7,4.

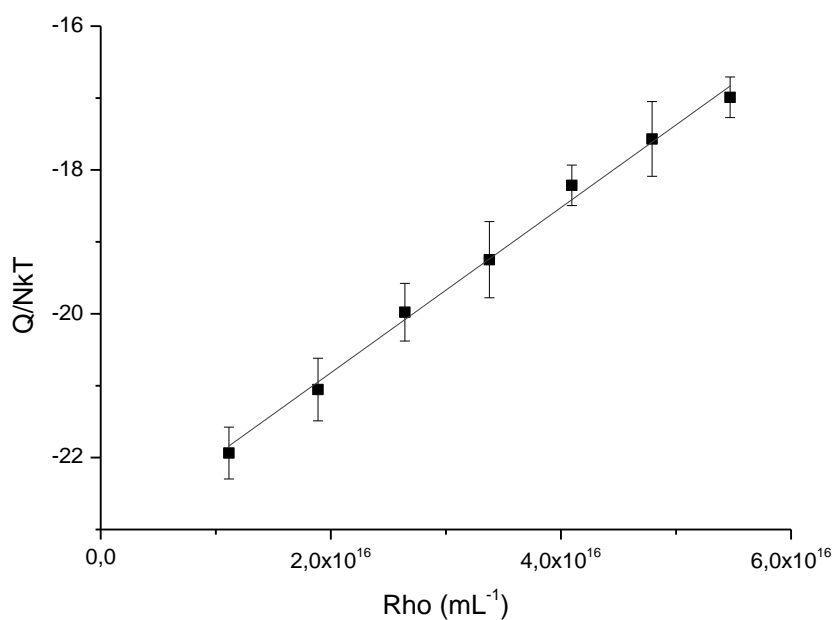


FIGURA A.3.16. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ NaCl EM pH 7,4.

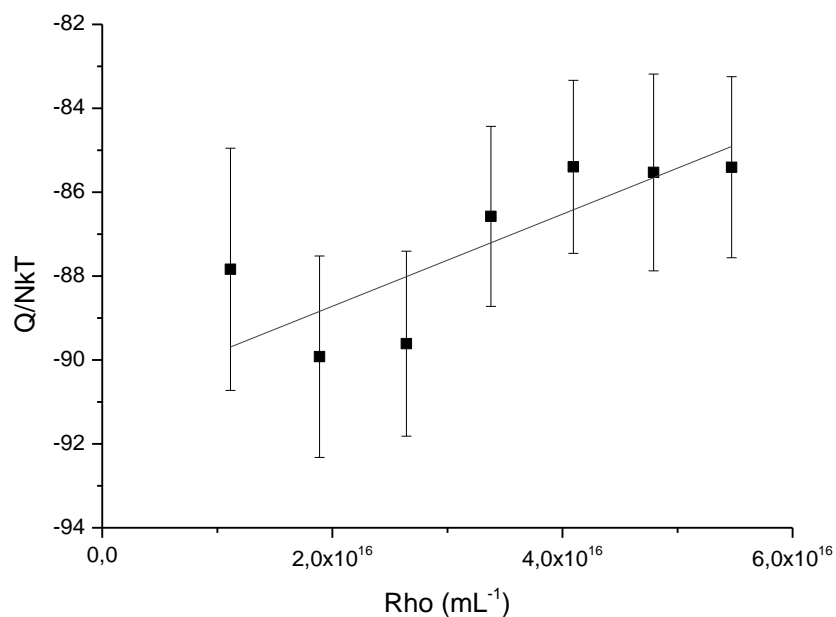


FIGURA A.3.17. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl EM pH 7,4.

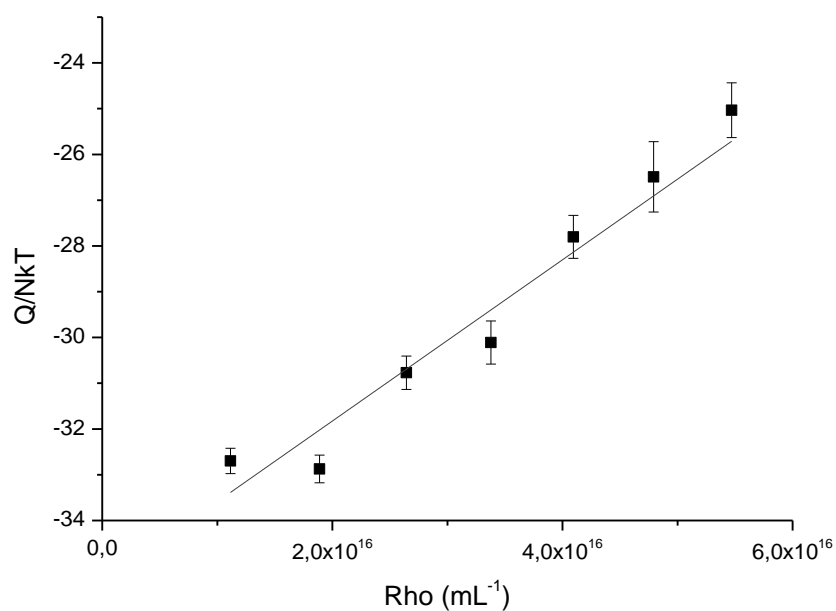


FIGURA A.3.18. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA BSA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,15 mol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ EM pH 7,4.

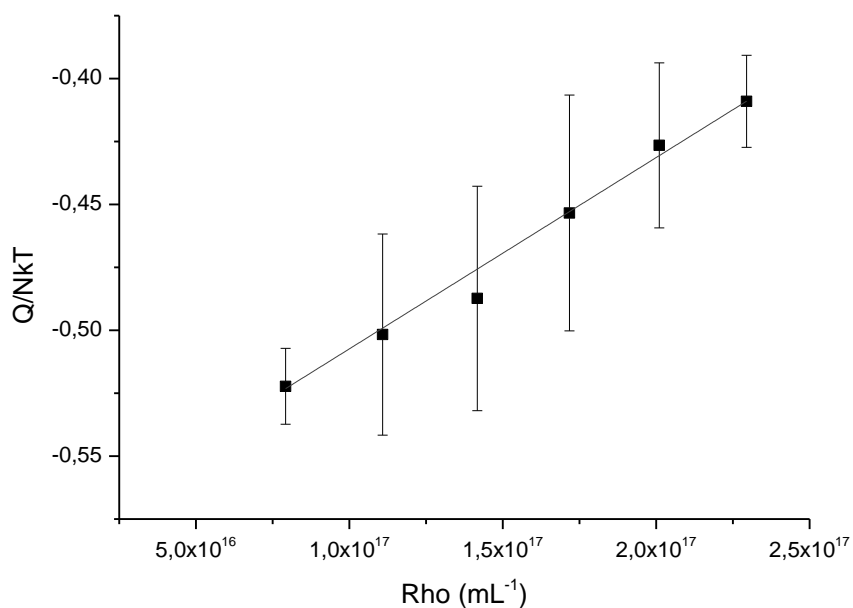


FIGURA A.3.19. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO EM pH 4,6.

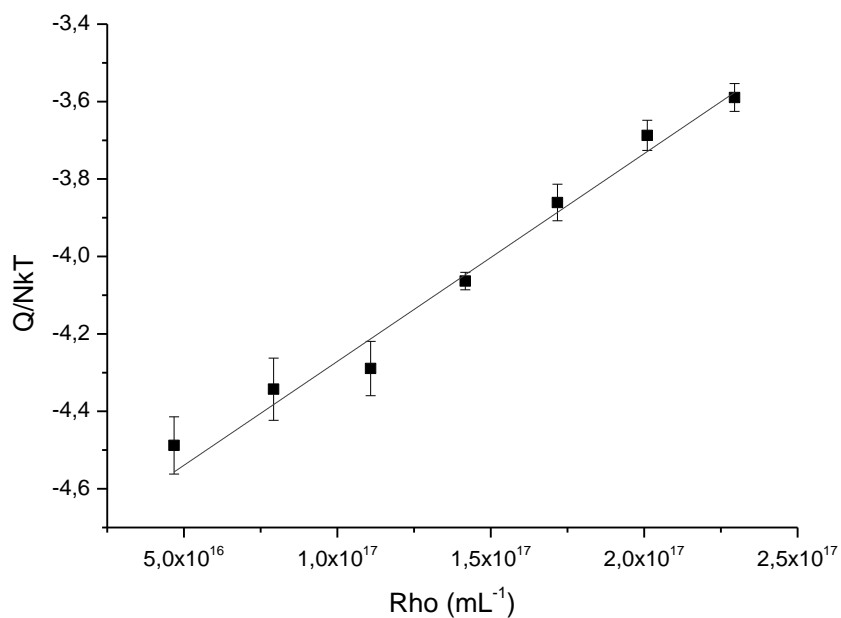


FIGURA A.3.20. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L^{-1} NaCl EM pH 4,6.

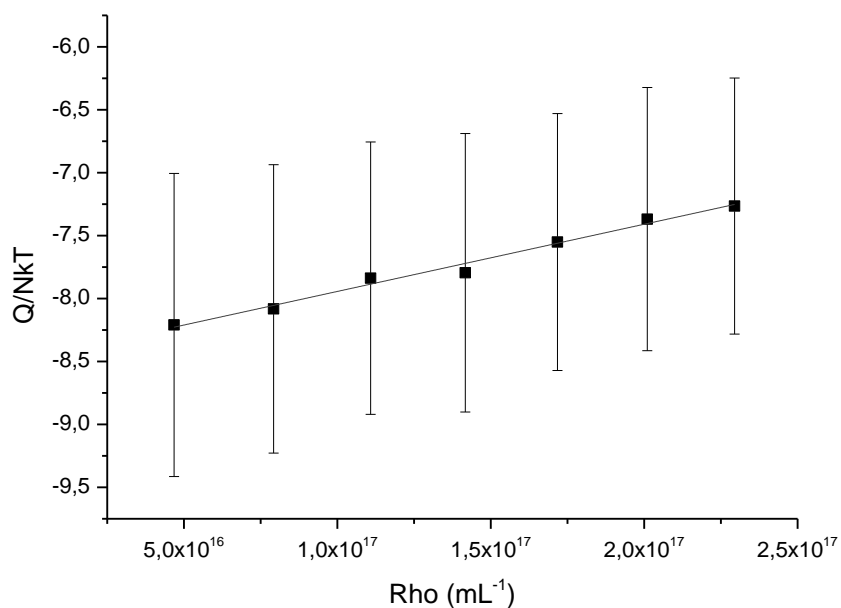


FIGURA A.3.21. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,20 mol L⁻¹ NaCl EM pH 4,6.

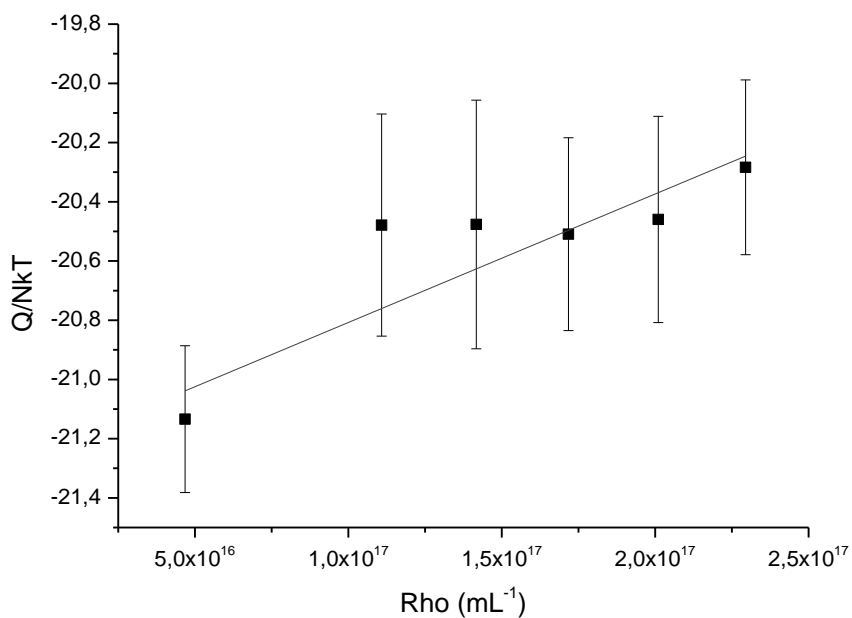


FIGURA A.3.22. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl EM pH 4,6.

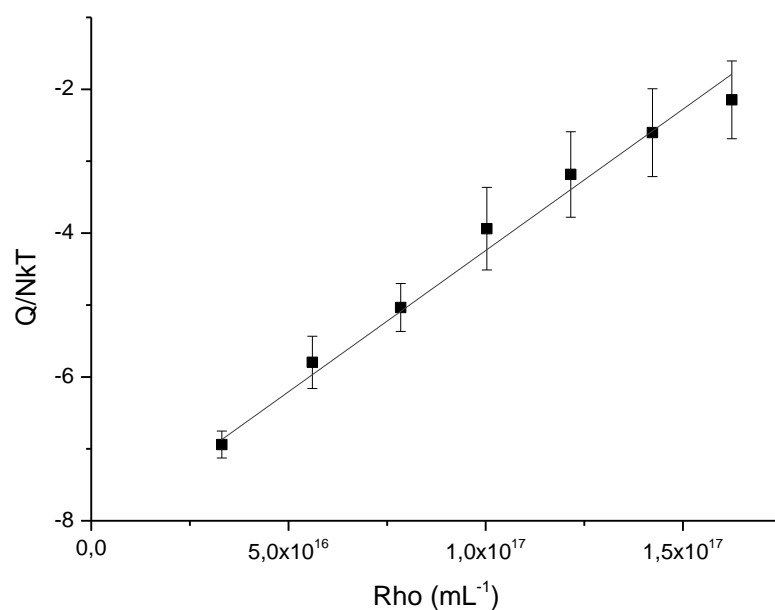


FIGURA A.3.23. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO EM pH 7,0.

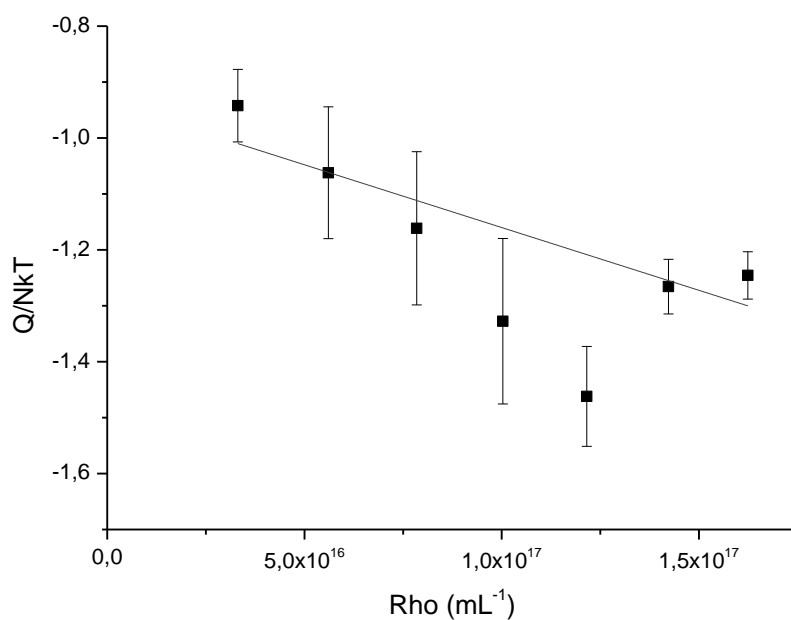


FIGURA A.3.24. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,10 mol L^{-1} NaCl EM pH 7,0.

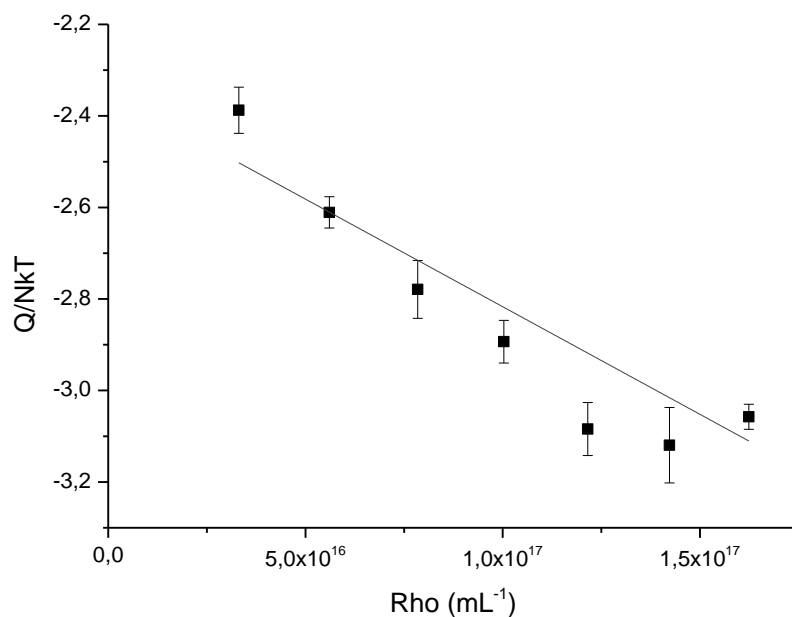


FIGURA A.3.25. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,20 mol L⁻¹ NaCl EM pH 7,0.

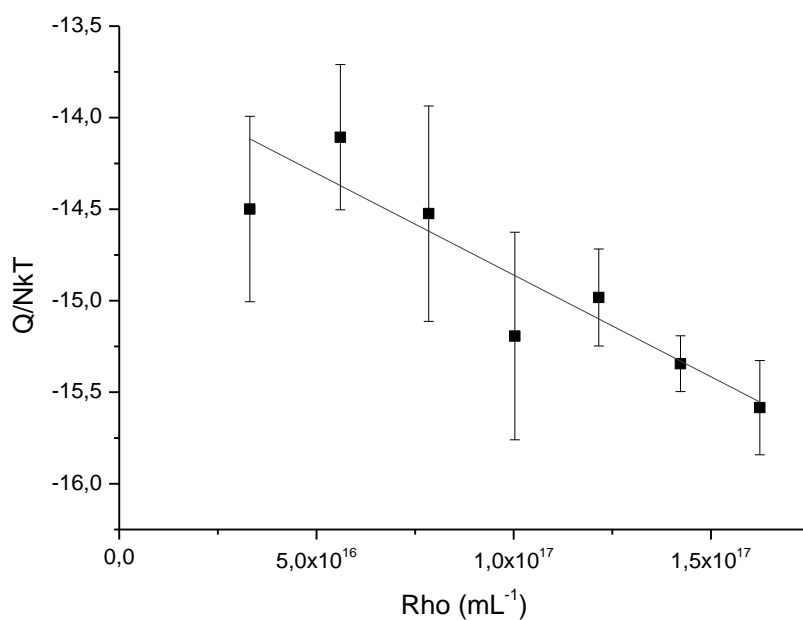


FIGURA A.3.26. AJUSTE LINEAR DA REPRESENTAÇÃO DE $Q/Nk_B T$ EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE PROTEICA ρ (RHO) PARA LISOZIMA SOBRE SOLUÇÃO TAMPÃO 0,50 mol L⁻¹ NaCl EM pH 7,0.